

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO  
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS  
ANTI-ZIKA VÍRUS VISANDO O DIAGNÓSTICO DA  
DOENÇA**

**Karla Patrícia Ribeiro Castro\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRA EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA

**Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria**

**Coorientadora: Profa. Dra. Grazielle de Oliveira Setti Gibin**

**\*Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP**

**2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Karla Patrícia Ribeiro Castro, realizada em 24/04/2020:

---

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria  
UFSCar

---

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor  
UNESP

---

Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha  
UFSCar

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Fillipe Vieira Rocha e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

---

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*Agradeço ao meu bondoso Deus*

*Aos meus amados pais Teresa Cristina e Múcio José*

*Aos meus queridos irmãos Kátia e Vitor e ao meu Padrasto Arnaldo*

*Ao meu querido noivo Hugo. Obrigada por tudo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu bondoso e grandioso Deus pelo dom da vida, por sempre me tratar com sua misericórdia e não pelos meus méritos.

Aos meus familiares, por me incentivarem e apoiarem em cada etapa do desenvolvimento da minha educação.

Ao meu querido noivo, Hugo, por ser meu amigo e me aconselhar nos momentos de difíceis.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela oportunidade em trabalharmos juntos, por ser um orientador sempre sereno, sincero e didático, além do incentivo no decorrer destes dois anos.

A minha coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Grazielle de Oliveira Setti Gibin, pela paciência, conselhos e por sempre está disponível a solucionarmos dificuldades no desenvolvimento do trabalho.

A todos meus professores que me formaram até aqui, sem eles não teria em mente a importância da educação básica.

A meu querido amigo Marco Suller, pela amizade sincera e engraçada, por sempre está disposto me ajudar, orientar e formar boa parte da minha personalidade profissional. Você sempre será um exemplo de pesquisador a ser seguido.

Aos meus amigos de longa data, Itaciara, Robertinha, Carla, Laíse, Jefferson, Pelrry, Lízia, Amanda, Leonardo, Neemias, Flávio, Amauri, Bárbara, Elízio, Iara e Higor, por momentos de muita descontração, pura alegria, conselhos e amizade sincera.

Aos meus amigos e colegas do LABIE, GQA e LABBES: Tássia, Grazielle, Taíse, Stephane, Wilson, Camila, Thaísa, Tay, Tiago, Bene, Danilo, Wallace, Cecília, Elsa e Ademar. Agradeço pela amizade e por participarem da minha formação científica com inúmeras discussões científicas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/04332-1, pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

Ao ICB/USP pela parceira no desenvolvimento do projeto, cedendo materiais e amostras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram/participaram dessa pesquisa.

Muito obrigada.

---

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>A</b>	Ampére
<b>Ab</b>	Anticorpo
<b>Ab<sub>1</sub></b>	Anticorpo monoclonal
<b>Ab<sub>2</sub></b>	Anticorpo policlonal
<b>Ab<sub>2</sub> – HRP</b>	Anticorpo policlonal IgG marcado com enzima peroxidase
<b>Ac</b>	Antígeno
<b>Ab/Ag</b>	Imunocomplexo anticorpo/antígeno
<b>Ab<sub>1ZIKV</sub></b>	Anticorpo monoclonal IgG anti-ΔNS1 do Zika Vírus
<b>Ab<sub>1DENV</sub></b>	Anticorpo monoclonal IgG anti-NS1 da Dengue Vírus
<b>BQ</b>	Benzoquinona
<b>CE</b>	do inglês <i>Counter Electrode</i>
<b>DENV</b>	Dengue vírus
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<b>ELISA</b>	do inglês: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>g</b>	grama
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HEPES</b>	Tampão Ácido ((N-(2-hidroietil)piperazina-N'-(2-etanosulfônico))
<b>HQ</b>	Hidroquinona
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>I</b>	Corrente
<b>IgG</b>	Anticorpos imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Anticorpos imunoglobulina M
<b>I<sub>p</sub></b>	Corrente de pico
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de afinidade
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociação

---

---

<b>L</b>	Litro
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>MES</b>	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
<b>Mol</b>	Unidade de quantidade de matéria
<b>n</b>	Nano ( $10^{-9}$ )
<b>n</b>	Réplicas
<b>N<sub>2</sub></b>	Gás nitrogênio
<b>NHS</b>	N-hidroxisuccinimida
<b><math>\Delta</math>NS1<sub>ZIKV</sub></b>	Fragmento da Proteína $\Delta$ NS1 recombinante do Zika vírus
<b>p</b>	pico ( $10^{-12}$ )
<b>PEEK</b>	Poliéter éter cetona (do inglês, <i>polyether ether ketone</i> )
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PM</b>	Partícula magnética
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PBS-TW20</b>	Tampão fosfato salino + Tween-20 0,05% (v/v)
<b>RSD</b>	Desvio-padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i> )
<b>RE</b>	do inglês <i>Reference Electrode</i>
<b>SPE</b>	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>screen-printed carbono electrode</i> )
<b>TW20</b>	Tween-20
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>V</b>	Volt
<b>WE</b>	do inglês <i>Work Electrode</i>
<b>ZIKV</b>	Zika vírus
<b><math>\mu</math></b>	micro ( $10^{-6}$ )

---

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Amostras de soro de pacientes utilizadas neste trabalho .....	24
<b>Tabela 2.</b> Estudo de adição e recuperação a partir de soro fetal bovino diluído e fortificado em diferentes concentrações de anticorpos $Ab_{1ZIKV}$ , $n \geq 4$ .....	33

---

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do ciclo urbano da transmissão da doença pelo mosquito. Fonte: Elaborada pela autora..... 2
- Figura 2.** Representação do diâmetro da cabeça de um bebê a) normal, b) com microcefalia, c) microcefalia grave. (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, CDC, domínio público, adaptada, 2018.)..... 3
- Figura 3.** Tempo de resposta imune (Fonte: PANG et al. adaptada, 2017<sup>49</sup>). ..... 5
- Figura 4.** Exemplos de diferentes analitos e estrutura básica de um biossensor<sup>59</sup>. ..... 7
- Figura 5.** Tipos de métodos possíveis utilizando o imunoensaio ELISA. (Fonte: AYDIN, S, adaptada, 2015<sup>73</sup>)..... 9
- Figura 6.** Representação esquemática do imunoensaio tipo sanduíche para a detecção do anticorpo Ab<sub>1ZIKV</sub> sobre a superfície do WE com um ímã posicionado externamente. .... 16
- Figura 7.** Representação esquemática das etapas de fabricação do dispositivo, a) recorte dos arranjos com impressora, b) transferência do adesivo de vinil recortado para folha de transparência, c) aplicação da tinta de carbono, e) retirada do vinil adesivo e dimensões do arranjo, f) aplicação da tinta de Ag|AgCl no eletrodo de pseudo-referência, g) retirada do vinil adesivo após processo de cura e dimensões do dispositivo contendo RE e CE. .... 17
- Figura 8.** Representação esquemática das a) etapas da montagem da célula microfluídica em folhas de transparência seguida de b) colagem do cartão dupla face. .... 18
- Figura 9.** a) Da esquerda para direita, arranjo contendo 8 eletrodos de trabalho, contra eletrodo e eletrodo referência, dispositivo acoplado ao injetor manual. b) Sistema microfluídico acoplado a válvula de injeção manual e ao multipotenciostato. .... 19

**Figura 10.** Esquema ilustrativo da a) etapa de modificação das PMs contendo grupamentos carboxilas que foram ativados com EDC, b) incubadas com a proteína  $\Delta\text{NS1}_{\text{ZIKV}}$  e após etapas de lavagens c) foram ressuspensas em tampão.

..... 20

**Figura 11.** Representação esquemática a) Captura do  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  na amostra fortificada ou amostra de pacientes utilizado o bioconjugado  $\text{PM}/\Delta\text{NS1}_{\text{ZIKV}}$  b) separação magnética e retirada do sobrenadante, c) adição da solução de  $\text{Ab}_2\text{-HRP}$  d) Separação magnética do biconjugado contendo  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  e  $\text{Ab}_2\text{-HRP}$  e) Ressuspensão do bioconjugado completo..... 21

**Figura 12.** Representação esquemática do procedimento para obtenção da resposta transiente de corrente para o imunoenensaio proposto..... 22

**Figura 13.** Imagens de a) eletrodo de trabalho, b) e c) MEV da superfície do eletrodo de trabalho, d) Imagem de MET das partículas magnéticas Dynabeads MyOne Carboxylic Acid sem ancoramento da proteína  $\Delta\text{NS1}_{\text{ZIKV}}$ . ..... 26

**Figura 14.** Perfis voltamétricos da a) avaliação de repetibilidade inter-arranjo, b) repetibilidade intra-arranjo, c) aplicação de diferentes velocidades de varredura e d) Variação da corrente de pico anódico em função do quadrado da velocidade de varredura. Sonda ácido ferroceno monocarboxílico  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

..... 28

**Figura 15.** a) Sinais transientes de corrente obtidos para  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  à  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  em diferentes tempos de incubações. Injeção de solução carreadora de PBS  $6,5$  contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e HQ  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Potencial aplicado de  $-0,2 \text{ V}$ . b) Média das correntes em diferentes tempos de incubação e seus respectivos brancos, ( $n \geq 4$ )..... 29

**Figura 16.** a) Sinais transientes de corrente obtidos para  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  à  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  em diferentes tempos de incubações. Injeção de solução carreadora de PBS  $6,5$  contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e HQ  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Potencial aplicado de  $-0,2 \text{ V}$ . b) Valores de média das correntes em diferentes tempos de incubação e seus respectivos brancos, ( $n \geq 4$ )..... 30

- 
- Figura 17.** a) Respostas transientes de corrente obtidas para o branco e em diferentes concentrações de  $Ab_{1ZIKV}$ , solução de detecção PBS 6,5 contendo  $H_2O_2$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e HQ  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . b) Curva analítica obtida para o biomarcador  $\Delta NS1_{ZIKV}$ , ( $n \geq 4$ )..... 31
- Figura 18.** a) Respostas transientes obtidos para a  $Ab_{1ZIKV}$  e branco com a injeção de uma mistura de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} H_2O_2$  e  $2,0 \text{ mmol L}^{-1} HQ$ . Potencial aplicado:  $-0,2 \text{ V}$ . b) Sinais transientes do biomarcador  $Ab_{1ZIKV}$  obtidos simultaneamente para um arranjo microfluídico, ( $n \geq 4$ )..... 32
- Figura 19.** Avaliação da reação cruzada de anticorpos  $Ab_{1DENV}$  na detecção de anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  em amostras de soro fetal bovino fortificado. Concentração de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  para ambos anticorpos utilizados. Valores de branco já descontados, ( $n \geq 4$ ). ..... 34
- Figura 20.** Resultados de corrente média obtidas em amostras contendo uma concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  de anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  e diferentes concentrações da proteína NS1 DENV3 preparadas em soro fetal bovino diluído, ( $n \geq 4$ ). ..... 36
- Figura 21.** Valores médios de correntes transiente obtidos para detecção do anticorpo  $Ab_{1ZIKV}$  em soro fetal bovino diluído. Concentração fixa de  $Ab_{1DENV}$   $200 \text{ ng mL}^{-1}$  e de  $Ab_{1ZIKV}$  em  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$ , com variação de concentrações de NS1 DENV3. Valores de branco já descontado, ( $n \geq 4$ ). ..... 37
- Figura 22.** Valores transientes de correntes obtidos para detecção do anticorpo  $Ab_{1ZIKV}$  em a) amostras de pacientes com ZIKV e/ou DENV diluídos 5200 vezes em PBS 7,4 b) adição da proteína NS1 DENV3 à  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , valores de branco já descontado, ( $n \geq 4$ ). ..... 39

---

---

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ZIKA VÍRUS VISANDO O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA. O vírus zika (ZIKV) é um *flavivirus* transmitido por espécies de mosquito *Aedes*. A doença pode ser assintomática ou apresentar quadros clínicos, como: conjuntivite, febre, dor de cabeça e, em casos graves, desenvolvimento de microcefalia fetal e síndrome de Guillain-Barré. A rápida disseminação do vírus e as dificuldades de diagnóstico requerem o desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade. Nesse cenário, propusemos um método eletroquímico para a detecção de anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  utilizando partículas magnéticas modificadas com uma proteína não estrutural recombinante ( $\Delta NS1_{ZIKV}$ ) e anticorpos anti-IgG marcados com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP). O método analítico proposto envolveu a fabricação do dispositivo microfluídico e um imunoensaio baseado em uma estratégia do tipo sanduíche. O dispositivo foi construído usando materiais de baixo custo e o layout do sistema consistia em um arranjo contendo oito eletrodos de trabalho, um eletrodo de pseudo-referência e um contra-eletrodo. A detecção eletroquímica foi realizada com base no ciclo eletrocatalítico da HRP, injetando uma solução contendo hidroquinona (HQ) (mediador redox) e  $H_2O_2$  como substrato. A corrente de pico catódica referente a redução do HQ foi obtida como sinal analítico e sua intensidade foi proporcional ao logaritmo da concentração de  $Ab_{1ZIKV}$ . O imunoensaio mostrou uma resposta linear na faixa de 0,01 a  $9,8 \times 10^5$   $pg\ mL^{-1}$  com equação de  $I_p(\mu A) = 0,04 + 0,01 C_{Ab_{1ZIKV}}$  obtido por regressão linear com coeficiente de correlação de 0,981. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,48  $pg\ mL^{-1}$  e 1,45  $pg\ mL^{-1}$ , respectivamente. O imunoensaio proposto mostrou-se eficiente na detecção de anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$ , apresentando baixo limite de detecção, garantindo uma ferramenta promissora para o diagnóstico da doença.

---

---

**ABSTRACT**

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF ANTI-ZIKA VIRUS ANTIBODIES AIMING THE DISEASE DIAGNOSIS. Zika Virus (ZIKV) is a *flavivirus* transmitted by *Aedes* species. The disease may be asymptomatic or present clinical such as: conjunctivitis, fever, headache, and in severe cases development of fetal microcephaly and Guillain-Barré syndrome. The rapid spread of the virus and the difficulties of diagnosis require development of alternative methods for diagnosis with high specificity and sensibility. In this scenario, we proposed an electrochemical method for detection of Ab<sub>1ZIKV</sub> antibodies using magnetic beads modified with a recombinant non-structural protein ( $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub>) and anti-IgG antibodies labeled with horseradish peroxidase enzyme (HRP). The analytical method proposed involved the fabrication of microfluidic device and an immunoassay based in a sandwich type strategy. The device was built using low-cost materials, and the system's layout comprised of an arrangement of 8-working electrodes, a pseudo-reference electrode, and a counter electrode. The electrochemical detection was performed based in the HRP electrocatalytic cycle by injecting a solution containing hydroquinone (redox mediator) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate. Cathodic peak current of HQ reduction was obtained as analytical signal and its intensity was proportional to the logarithm concentration of Ab<sub>1ZIKV</sub>. The immunoassay showed a linear response in the range of 0.01 to 9.8×10<sup>5</sup> pg mL<sup>-1</sup> presented an equation of  $I_p(\mu\text{A}) = 0.04 + 0.01 C_{\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}}$  obtained by linear regression with a correlation coefficient of 0.981. The limit of detection and quantification obtained were of 0.48 pg mL<sup>-1</sup> and 1.45 pg mL<sup>-1</sup>, respectively. The proposed immunoassay proved to be efficient for the detection of anti-ZIKV antibodies, presenting a low limit of detection, ensuring be a promise tool for diagnosis of the disease.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Vírus da Zika.....	1
1.2 Transmissão e sintomas .....	2
1.3 Biomarcadores.....	4
1.4 Proteína NS1 do ZIKV (NS1 <sub>ZIKV</sub> ).....	4
1.5 Anticorpos IgM e IgG utilizados para detecção de ZIKV .....	5
1.6 Biossensores e Imunossensores .....	6
1.8 Anticorpos conjugados com marcadores eletroquímicos .....	10
1.9 Eletrodos descartáveis obtidos por serigrafia (SPE).....	11
1.10 Sistemas microfluídicos .....	12
2. OBJETIVO.....	13
Geral.....	13
Específicos .....	13
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	14
3.1 Reagentes e soluções.....	14
3.2 Materiais e Equipamentos .....	15
3.3 Desenvolvimento do Imunoensaio eletroquímico .....	15
3.3.1 Ensaio do tipo sanduíche para determinação do Ab <sub>ZIKV</sub> utilizando partículas magnéticas e sistema microfluídico.....	15
3.3.2 Construção dos eletrodos para o dispositivo microfluídico.....	16
3.3.3 Sistema microfluídico .....	18
3.3.4 Modificação das Partículas Magnética com a proteína $\Delta$ NS1 <sub>ZIKV</sub> .....	19
3.3.5 Captura do Ab <sub>ZIKV</sub> em amostras ou amostras fortificadas .....	20
3.4 Detecção do anticorpo Ab <sub>ZIKV</sub> via amperometria.....	21
3.5 Ensaio de Adição e recuperação.....	22
3.6 Ensaio de reação cruzada.....	23
3.6.1 Ensaio de reação cruzada com anticorpos padrão de Dengue (Ab <sub>IDENV</sub> ).....	23

---

3.6.2 Ensaio de reação cruzada com a proteína NS1 da Dengue subtipo 3 (DENV3).....	23
3.6.3 Ensaio de reação cruzada com $Ab_{1DENV}$ e DENV3 .....	23
3.7 Caracterizações eletroquímicas e estudo de repetibilidade referente a construção dos dispositivos eletroquímicos.....	24
3.8 Amostras de soro de pacientes e amostras fortificadas .....	24
3.9 Fragmento da Proteína $\Delta NS1$ recombinante do ZIKV .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Caracterização morfológica dos eletrodos e PMs utilizadas e caracterização eletroquímica do dispositivo construído .....	26
4.2 Detecção dos anticorpos $Ab_{1ZIKV}$ via amperometria utilizando enzima HRP como marcador eletroquímico .....	28
4.3 Otimização das condições experimentais .....	28
4.3.1 Estudo do Tempo de incubação do anticorpo $Ab_{1ZIKV}$ com as PMs modificadas com $\Delta NS1_{ZIKV}$ .....	28
4.3.2 Tempo de incubação do anticorpo $Ab_2 - HRP$ .....	29
4.4 Curva Analítica .....	30
4.6 Ensaio de Adição e Recuperação .....	33
4.7 Avaliação da reação cruzada.....	33
4.7.1 Ensaio de reação cruzada com anticorpos padrão de Dengue ( $Ab_{1DENV}$ ).....	34
4.7.2 Ensaio de reação cruzada com a proteína NS1 da Dengue tipo 3 (DENV3).....	35
4.7.3 Ensaio de reação cruzada com $Ab_{1DENV}$ e DENV3 .....	36
4.8 Aplicação do imunoenensaio em amostras de pacientes .....	37
5. CONCLUSÕES .....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Vírus da Zika

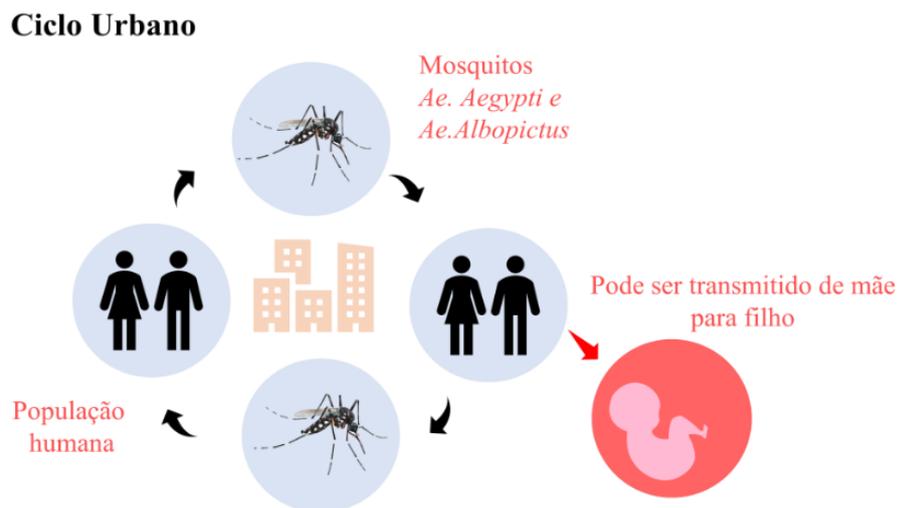
O vírus Zika (ZIKV) contém uma cadeia simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente de 30 a 45  $\mu\text{m}$  de diâmetro<sup>1</sup>. É um arbovírus, membro da família *Flaviviridae* e de gênero *Flavivirus*, assim como a febre amarela, Dengue, Chikungunya<sup>2,3</sup>. O ZIKV foi primeiramente isolado em 1947, no sangue de macacos *Rhesus*, em pesquisas sobre febre amarela, na floresta de Zika, Uganda, e em 1948 foi isolado no mosquito *Aedes africanus*<sup>4</sup>. O reconhecimento desta doença em humanos ocorreu em 1953, sendo confirmados em três casos na Nigéria<sup>5</sup>. O vírus é dividido em duas linhagens filogenéticas: asiática e africana<sup>6</sup>, seu genoma possui aproximadamente 11 kbs de comprimento e codifica sete proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) e três estruturais (Capsídeo [C]– Precursor da Membrana [prM] – Envelope [E])<sup>7</sup>.

Casos isolados ocorreram em partes da Ásia e África<sup>8,9</sup> porém em 2007 ocorreu o primeiro grande surto da doença em humanos, na ilha de Yap, localizada na Micronésia<sup>10</sup>. Em 2015 sucedeu o primeiro relato da infecção do ZIKV nos continentes americanos, espalhando-se rapidamente na América Central, do Sul, e Caribe<sup>9</sup>, o Brasil obteve o maior registro de casos da doença no mundo<sup>11,12</sup>. No mesmo ano, foi comunicado que o Zika vírus era o causador do surto no nordeste brasileiro, na cidade de Natal, (Rio Grande do Norte, Brasil). Os infectados apresentavam sintomas leves, porém rapidamente o ZIKV alastrou-se para 18 estados no país<sup>13,14</sup>. Inicialmente suspeitavam-se, para o causador do surto, a Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), rubéola, parvovírus B19, sarampo, e os vírus do gênero *enterovírus*, no entanto os resultados eram negativos para estes e assim incluiu-se posteriormente o

ZIKV<sup>15</sup>. No mundo, até Fevereiro de 2018, o vírus foi documentado em 85 países<sup>16</sup>.

## 1.2 Transmissão e sintomas

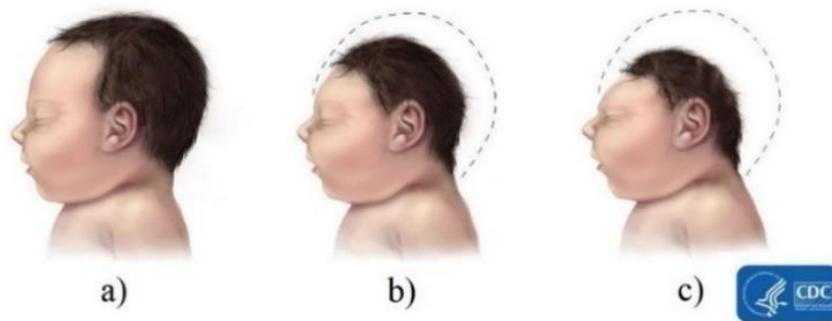
Nas Américas, geralmente a transmissão ocorre pela picada do mosquito *A. aegypti* e/ou *A. albopictus*, em meio urbano<sup>17</sup> (Figura 1), mas podem ocorrer por outros mecanismos de contágio como por exemplo: a transmissão vertical durante a gravidez<sup>18,19</sup>, sexual<sup>20,21,22</sup> e também por meio do risco potencial via transfusão de sangue<sup>23</sup>. Estudos recentes relatam que o vírus da Zika foi isolado em outros fluidos humanos como na saliva e na urina, podendo ser outras vias de disseminação<sup>24</sup>. A infecção vertical por amamentação não foi relatada, mas houve a detecção de partículas viriais neste fluido<sup>17,25</sup>.



**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo urbano da transmissão da doença pelo mosquito. Fonte: Elaborada pela autora.

O período de incubação da doença varia de 3 a 12 dias. Larga faixa etária da população está sujeita a contaminação. A doença pode ser assintomática ou apresentar quadros clínicos como: Conjuntivite, febre, dor de cabeça, mialgia macular ou maculopapular e artralgia, outro sintoma associado ao ZIKV é a microcefalia<sup>26</sup> sendo um tipo de anomalia congênita (Figura 2) que afeta o crescimento craniano inicial, que é dada por meio da medida da circunferência

da cabeça (*Head Circumference* - HC), levando em consideração o gênero e a idade do paciente<sup>27</sup>. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, para recém-nascidos, o valor médio para o crânio é de 31,5 cm e 31,9 cm, para meninas e meninos respectivamente<sup>18,28</sup>, se o valor for de 2 pontos abaixo da média o indivíduo apresenta a doença<sup>16,29,30</sup>, já outros estudos sugerem que esse valor é de 3 pontos abaixo da média<sup>31,32</sup>.



**Figura 2.** Representação do diâmetro da cabeça de um bebê a) normal, b) com microcefalia, c) microcefalia grave. (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities, CDC, domínio público, adaptada, 2018.)

Estudos relacionam a microcefalia com o ZIKV, uma vez que o vírus apresentou neuropatismo (afinidade pelo sistema nervoso) em camundongos infectados, em especial os que tem 2 semanas de idade<sup>1</sup>, indicando que o vírus atua nas células nervosas do feto<sup>33</sup>. Em humanos a relação foi confirmada pela detecção do genoma viral no sangue e em amostras de tecido de um recém-nascido com microcefalia que faleceu logo após o nascimento. Teste preliminares sugerem que a infecção ocorre no primeiro trimestre da gravidez<sup>34</sup> e estudos recentes apontam forte associação entre casos de microcefalia e infecção por ZIKV<sup>29</sup>. Durante a gravidez, a infecção por este vírus tem sido relacionada a abortos espontâneos, natimortos, infecção fetal, restrição de crescimento intrauterino (RCIU), ruptura prematura de membranas e parto prematuro<sup>35,36</sup>.

### 1.3 Biomarcadores

A Organização Mundial da Saúde descreve biomarcadores como “toda a substância, estrutura ou processo que pode ser quantificado no organismo e em fluidos biológicos, que pode influenciar ou predizer a incidência de um acontecimento ou de uma doença”.<sup>37</sup>. De maneira mais ampla, biomarcadores são compostos que servem como indicadores de processos biológicos e patológicos, ou respostas fisiológicas e farmacológicas a um tratamento medicamentoso<sup>38</sup>. Logo, biomarcadores podem ser aplicados para diagnósticos, em determinações de estágios de doenças, na evolução, prognóstico e no monitoramento da resposta a um tratamento<sup>39</sup>.

### 1.4 Proteína NS1 do ZIKV (NS1<sub>ZIKV</sub>)

O vírus replica-se em células dendríticas ocorrendo assim a viremia, de duração média de até 5 dias após o aparecimento dos sintomas. O diagnóstico nesta fase pode ser realizado pela detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR, pela detecção do vírus pelo isolamento em cultura de células, ou pela detecção da proteína NS1 de 46–55 kDa, que é secretada pelas células infectadas no sangue, na forma de dímero produzindo uma resposta humoral forte, sendo denominada então como antígeno<sup>40–42</sup>. A proteína NS1 é considerada um bom alvo para sorodiagnóstico de flavivírus<sup>41,42</sup>. Logo, esta proteína é um importante biomarcador da infecção aguda, sendo utilizada correntemente como antígeno base para os métodos de diagnóstico laboratoriais, pois é encontrada em elevados níveis no sangue, é frequentemente detectada antes do início dos sintomas no indivíduo<sup>41</sup>.

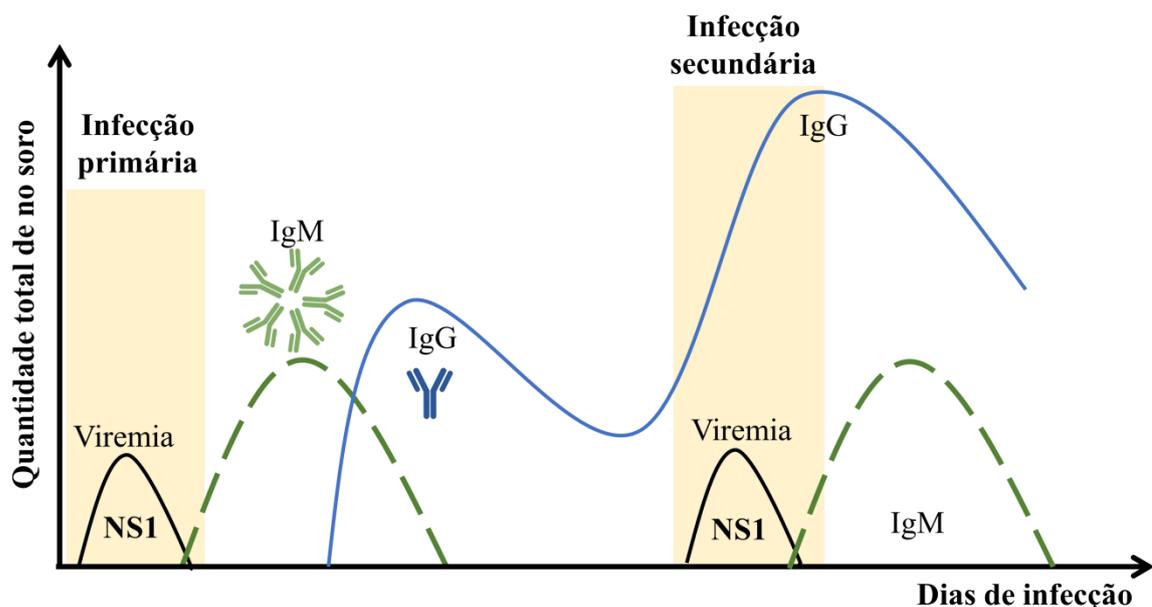
Todos os genes NS1 dos *flavivírus* compartilham um alto grau de homologia, podendo gerar reações cruzadas entre os diferentes vírus, uma vez que a diferenciação ocorre somente devido características eletrostáticas diferentes dos oriundos do ZIKV<sup>41–44</sup>, dificultando o diagnóstico diferencial

entre as doenças como a Dengue. Devido a curta viremia, o diagnóstico pela detecção de anticorpos imunoglobulina M (IgM) e anticorpos imunoglobulina G (IgG), na infecção aguda e de convalescência respectivamente, é de grande relevância.

### 1.5 Anticorpos IgM e IgG utilizados para detecção de ZIKV

Geralmente em infecções causadas por vírus, a evolução temporal para a produção de anticorpos anti-flavivírus ocorre após o início dos sintomas no indivíduo infectado, via a resposta inicial dos anticorpos IgM, que são os primeiros a serem produzidos em uma resposta imunológica.

Neste estágio, pode ser realizada por meio de testes como o ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) no formato MAC-ELISA, por ensaios de inibição da hemaglutinação (HI) e por teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Nos demais estágios da doença, é observada a resposta imune do anticorpo IgG e sua detecção também pode ser feita por testes de ELISA e PRNT, dentre outros <sup>45-48</sup>. Assim, a detecção de IgM e/ou IgG pode dar indício da imunidade adquirida a curto prazo e da imunidade adquirida a longo prazo, de uma infecção por *flavivirus* respectivamente (Figura 3)<sup>45,49</sup>.



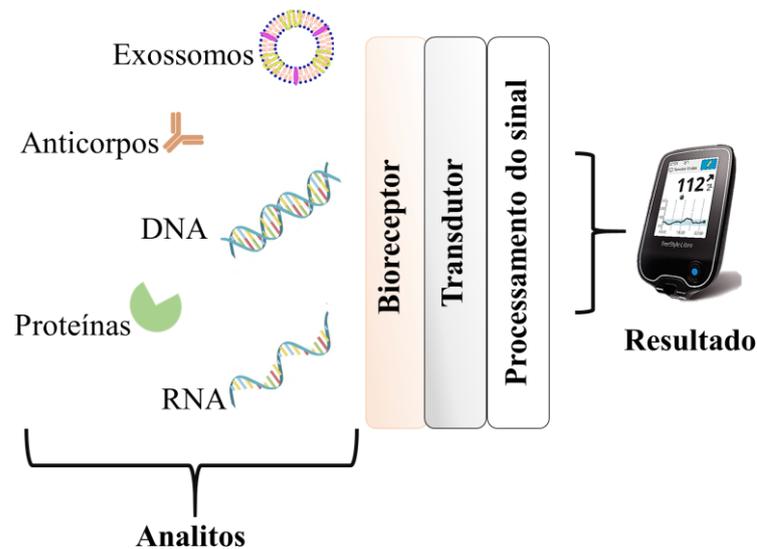
**Figura 3.** Tempo de resposta imune (Fonte: PANG et al. adaptada, 2017<sup>49</sup>).

Apesar de serem considerados métodos importantes nas detecções de biomarcadores, estes apresentam elevado custo de aquisição, operação, elevado tempo de análise, grande volume de amostra e podem apresentar alta possibilidade de resultados falsos positivos ou negativos<sup>50-52</sup>.

Em todo Brasil, estima-se que apenas cem amostras de pacientes infectados com Zika vírus podem ser avaliados por semana, através da infraestrutura existente para todo o país<sup>53,54</sup>. Assim, juntamente com a dramática proliferação deste vírus no país, destaca-se a necessidade de desenvolvimento de dispositivos portáteis para triagem rápida. Com isso, sensores e biossensores eletroquímicos vêm recebendo elevada atenção da comunidade científica devido à vantagens como: portabilidade, fácil automação e potencial aplicação como dispositivos em ponto de atendimento e boa sensibilidade e especificidade<sup>55,56</sup>.

### 1.6 Biossensores e Imunossensores

Biossensores são dispositivos que utilizam reações bioquímicas específicas para detectar um analito de interesse, gerando sinais proporcionais à concentração do mesmo<sup>56,57</sup>. A Figura 4 apresenta a estrutura básica de biossensor, sendo: I) Bioreceptor – composto responsável por reconhecer o analito, podem ser enzimas, anticorpos, organelas, dentre outras. II) Transdutor – um elemento que converte uma forma de energia em outra, podendo ser um transdutor óptico, térmico, de massa ou eletroquímico, e dentro dos transdutores eletroquímicos: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico e impedimétrico, III) Parte eletrônica – responsável por processar o sinal, IV) Apresentação do resultado é interpretado pelo usuário, através de equipamentos como computadores e/ou visores, o sinal de saída pode ser apresentado como sinal numérico, imagens e em formas de gráficos<sup>56-58</sup>.



**Figura 4.** Exemplos de diferentes analitos e estrutura básica de um biossensor<sup>59</sup>.

Se o biossensor é baseado na interação anticorpo/antígeno, ele recebe o a denominação de imunossensor<sup>60,61</sup>. Anticorpos são glicoproteínas produzidas pelo sistema imunológico a fim de combater patógenos entre outros compostos estranhos ao organismo, a parte do patógeno que reage com o anticorpo (Ab) recebe o nome de antígeno (Ag)<sup>62,63</sup>. Em 1950, anticorpos foram usados pela primeira vez em procedimentos de análise, sendo precursores para imunodiagnósticos. Dezesesseis anos depois, iniciou-se a produção de anticorpos monoclonais ( $Ab_1$ ) que são anticorpos que reconhecem apenas um epítipo ou são restritos à um antígeno, o que permitem maior especificidade dos ensaios existentes quando comparados aos anticorpos policlonais ( $Ab_2$ ) que reconhecem múltiplos epítipos em um mesmo antígeno<sup>64-67</sup>.

Em um imunossensor eletroquímico convencional, o anticorpo ou o antígeno é imobilizado na superfície do eletrodo. O anticorpo liga-se especificamente ao antígeno correspondente, e há formação de um imunocomplexo (Ab:Ag), (Equação 1). O imunocomplexo é caracterizado pela constante de afinidade ( $K_a$ ) (Equação 2) que é dada pela razão entre a concentração do imunocomplexo e o produto das concentrações do anticorpo e antígeno livres. A reação de formação de um imunocomplexo possui valores de

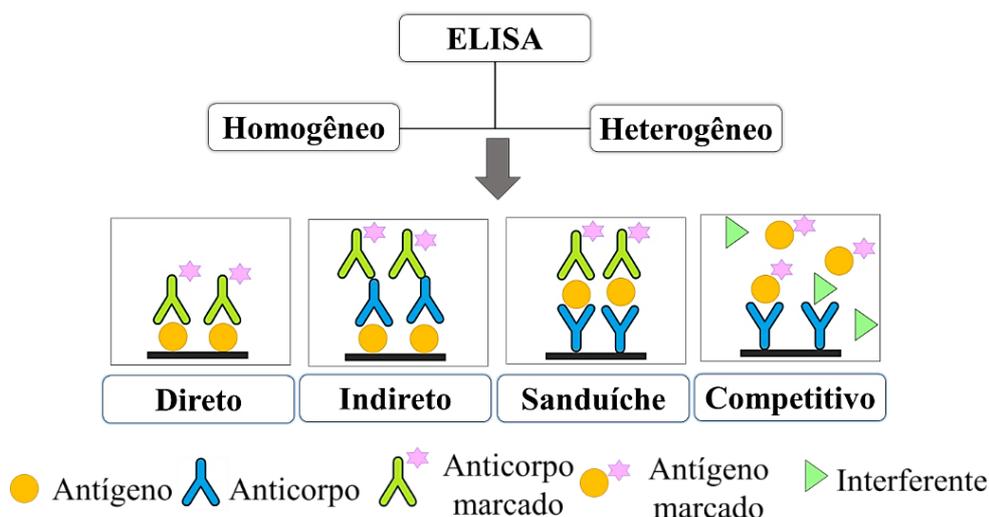
$K_a$  entre  $10^4$  e  $10^{12}$  L mol<sup>-1</sup> o que permitem obter métodos analíticos com elevada sensibilidade e relativamente baixos limites de detecção<sup>68-70</sup>.



$$K_a = \frac{[Ab:Ag]}{[Ab][Ag]} \quad (2)$$

Para a obtenção do sinal analítico, tanto o anticorpo como o antígeno, podem ser marcados com materiais que possam gerar sinal que possa ser medido experimentalmente, uma vez que o evento de ligação para formação do imunocomplexo não gera um sinal mensurável<sup>57,59,71</sup>. Um anticorpo ligado a um marcador recebe a denominação de conjugado, exemplos de alguns marcadores eletroquímicos utilizados são: enzimas, como as peroxidases, além de nanopartículas de ouro (AuNPs), nanotubos de carbono, *quantum dots* e etc. Inicialmente, os imunoenaios utilizavam marcadores radioativos, mas como alternativa de menor risco foram desenvolvidos ensaios com substâncias fluorescentes ou enzimáticas como acima descritas<sup>69,72</sup>.

A detecção de biomarcadores proteicos em análises clínicas de rotina é normalmente realizada através da utilização do ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que é um ensaio de fase sólida heterogênea. O ELISA apresenta boa sensibilidade e especificidade, porém como desvantagem têm-se um elevado custo, o longo tempo de análise exigindo um grande número de etapas, laboratórios especializados e além de requerer um volume relativamente elevado de amostras. De maneira breve, esta metodologia pode ser dividida em fase homogênea, que apresenta facilidade de uso, porém baixa sensibilidade, e heterogênea, mais amplamente utilizada, mais sensível que o homogêneo. Pode ser do tipo direto, indireto, sanduíche ou competitivo conforme representado na Figura 5<sup>73</sup>.



**Figura 5.** Tipos de métodos possíveis utilizando o imunoenensaio ELISA. (Fonte: AYDIN, S, adaptada, 2015<sup>73</sup>).

### 1.7 Imunossensores eletroquímicos para detecção de biomarcadores para ZIKV

Diferentes trabalhos envolvendo o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção da proteína NS1 do ZIKV ou de anticorpos específicos para ZIKV como biomarcadores para a doença Zika vírus podem ser encontrados na literatura, embora estes tenham sido poucos, sendo a na maioria deles voltados para a detecção da proteína NS1<sub>ZIKV</sub><sup>74</sup>. Alguns desses trabalhos estão descritos abaixo.

Faria e colaboradores relataram o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de ZnO imobilizadas com anticorpos específicos para ZIKV em uma placa de circuito impresso. O imunossensor permitiu a detecção em urina fortificada com a proteína NS1<sub>ZIKV</sub>, sem reatividade cruzada com o antígeno DENV-NS1, apresentando intervalo linear de 0,1 ng mL<sup>-1</sup> a 100 ng mL<sup>-1</sup> e limite de detecção menor que 1,0 pg mL<sup>-1</sup><sup>75</sup>.

Um imunossensor portátil a base de grafeno, modificado com anticorpos monoclonais específicos para ZIKV permitiu a detecção quantitativa e em tempo real de antígenos virais nativos do Zika em tampão PBS 7,4 bem como em

amostra sintética de soro. A seletividade foi validada usando a proteína NS1 da encefalite japonesa. O limite de detecção de  $0,45 \text{ nmol L}^{-1}$  foi alcançado<sup>76</sup>.

Cabral *et al.* desenvolveram um imunossensor baseado na imobilização da proteína NS1 do ZIKV em eletrodos à base de carbono, para detecção de anticorpos específicos para Zika vírus no sangue e na saliva de pacientes. O dispositivo apresentou baixa reação cruzada com a Dengue, apresentando um excelente limite de detecção de  $17 \text{ fg mL}^{-1}$ <sup>77</sup>.

Wang e colaboradores desenvolveram um imunossensor capacitivo capaz de detectar especificamente os anticorpos ZIKV, utilizando um sensor modificado a proteína do envelope (E) do ZIKV. O sistema de detecção de anticorpos discrimina os anticorpos com pouca reatividade cruzada, indicando acentuada seletividade. O limite de detecção foi aproximadamente 10 moléculas de anticorpo por  $30 \mu\text{L}$  em tampão PBS 7,4<sup>54</sup>.

Kaushik *et al.* Confeccionaram um imunossensor eletroquímico para a detecção de proteína do envelope (E) do vírus Zika, utilizando um microeletrodo interdigitado de ouro. O chip de foi preparado via imobilização do anticorpo específico para a proteína (E) do ZIKV. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada para medir a resposta elétrica do chip desenvolvido em função das concentrações de proteína ZIKV. Os resultados dos estudos EIS confirmaram que o chip sensor detectou a proteína ZIKV seletivamente e exibiu um intervalo de detecção de  $10 \text{ pM}$  à  $1 \text{ nM}$  e um limite de detecção de  $10 \text{ pM}$ <sup>78</sup>.

### **1.8 Anticorpos conjugados com marcadores eletroquímicos**

Devido a não atividade eletroquímica das biomoléculas que normalmente são utilizadas nas etapas de detecção, utilizam-se imunoenaios eletroquímicos indiretos, que consistem na avaliação da concentração do analito através da reação de uma substância eletroativa ou pela reação catalisada por uma enzima

como por exemplo, peroxidase de raiz forte (HRP de *Horseradish peroxidase*), glicose oxidase (GOx) e a Fosfatase alcalina (ALP)<sup>71</sup>.

A enzima HRP é uma glicoproteína globular com massa de aproximadamente 52 kDA, e é amplamente utilizada em ensaios eletroquímicos devido seu pequeno tamanho e elevada estabilidade, podendo ser ativada através da adição de peróxido de hidrogênio, que é responsável por oxidar o grupo heme da enzima, podendo sua atividade enzimática ser monitorada eletroquimicamente por meio com consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou com o uso de mediadores redox<sup>79-81</sup>.

### 1.9 Eletrodos descartáveis obtidos por serigrafia (SPE)

Eletrodos impressos consistem na aplicação de uma tinta condutora sobre um substrato isolante como policloreto de vinila (PVC), poliéster ou alumina, sendo coberto por uma camada isolante de forma a definir a área geométrica exposta dos eletrodos<sup>82</sup>. A fabricação destes dispositivos pode ser feita por diferentes técnicas, dentre estes se encontram: serigrafia<sup>83</sup>, por impressão de transferência de estampagem<sup>84</sup>, por jato de tinta<sup>85</sup>.

O método de serigrafia vem sendo bastante estudada, sendo utilizado diversos tipos de substratos, visando a sua aplicabilidade. Esta técnica possibilita a fabricação de eletrodos com boa reprodutibilidade com diferentes formatos bem como permite realizar modificações químicas na superfície do eletrodo de trabalho por meio da incorporação de diferentes compostos diretamente na tinta, de forma simples e com baixo custo<sup>86-88</sup>.

Atualmente no mercado, existem tintas à base de carbono, prata e ouro para a construção dos eletrodos, influenciando diretamente da aplicação desejada, uma vez que as diferentes tintas terão efeitos significativos nas propriedades eletroquímicas do sensor<sup>89</sup>. É interessante também que para a aplicação de tais dispositivos não sejam necessários grandes volumes de amostras para as realizações das etapas de detecção, logo, para a confecção da célula eletroquímica composta por eletrodo de trabalho – WE (do inglês *Work*

*Electrode*), referência – RE (do inglês *Reference*) e contra eletrodo – CE (do inglês *Counter Electrode*) podem estar dispostos a uma pequena distância permitindo trabalhar com pequeno volume de solução<sup>90</sup>.

### 1.10 Sistemas microfluídicos

Plataformas microfluídicas ( $\mu$ FD) são amplamente aplicadas em análise clínicas e no desenvolvimento de sistemas de diagnósticos *point-of-care*, uma vez que estes sistemas têm como vantagens: baixo consumo de reagentes, baixo custo e com amplas possibilidades de automação<sup>91,92</sup>. Normalmente são fabricados com materiais como vidro ou polímeros dentre outros<sup>93</sup>. O nosso Grupo de Pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de técnicas de fabricação destes dispositivos de maneira rápida, consistindo na utilização de filmes adesivos como cartão de poliestireno com adesivo dupla face recortado com auxílio de uma impressora doméstica, criando os canais microfluídicos<sup>86,93,94</sup>. Esta técnica desenvolvida, comparada a outras utilizadas para a fabricação destes dispositivos (Moldagem por injeção, Litografia, estampagem a quente) pode ser considerada mais rápida e menos complexa e menor custo<sup>95-98</sup>.

### 1.11 Partículas magnéticas (PMs)

Partículas magnéticas são materiais a base de óxido de ferro que podem facilmente ser modificadas com diferentes grupos funcionais tais como: aminas, carboxílicos e tosila<sup>99,100</sup>. Suas propriedades específicas como estabilidade coloidal, resposta rápida ao campo magnético aplicado e presença de grupos funcionais na superfície são essenciais para suas aplicações analíticas<sup>101</sup>. A utilização das PMs em imunoenaios podem agregar ainda outras vantagens como: Grande capacidade de ancoramento de moléculas e biomoléculas, captura do analito, redução de interferentes, pré-concentração e além de dependendo da sua aplicação, pode também permitir uma amplificação do sinal analítico, uma

vez que pode permitir a utilização de partículas magnética que venha a possuir uma maior quantidade de marcador eletroquímico<sup>102,103</sup>.

## 2. OBJETIVO

### Geral

- Desenvolver imunoenaios eletroquímicos para o diagnóstico de Zika Vírus por meio da detecção dos anticorpos anti-NS1 do ZIKV, em amostras de soro, utilizando partículas magnéticas decoradas com  $\Delta\text{NS1}_{\text{ZIKV}}$ , eletrodos serigrafados e sistema microfluídico.

### Específicos

- Construir dispositivos descartáveis e de baixo custo, por meio de métodos serigráficos;
- Otimizar condições experimentais utilizadas no imunoenasão;
- Estudar a influência do anticorpo e NS1 de dengue tipo três na detecção do  $\text{Ab}_{\text{ZIKV}}$ .
- Determinar a melhor estratégia para a detecção eletroquímica do anticorpo  $\text{Ab}_{\text{ZIKV}}$ .

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reagentes e soluções

Cloreto de sódio, hidróxido de sódio, fosfato de sódio dibásico, Tween-20, poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA) e cloreto de potássio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Tintas condutora à base de carbono (C2160602D2) e tinta de prata (C2051014P10) foram obtidas da Gwent Electronic Materials Ltd, UK. Partículas magnéticas *Dynabeads MyOne Carboxylic Acid* (65012) e anticorpos monoclonais IgG *anti-mouse* NS1 ZIKV – Ab<sub>1ZIKV</sub> (EA88) foram obtido da Invitrogen, anticorpos monoclonais IgG *anti-mouse* NS1 DENV – Ab<sub>1DENV</sub> (SQab1502, Arigobio) foram cedidos pelo grupo de pesquisa do professor Paulo Bueno UNESP/Araraquara. Proteína  $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub> recombinante, bem como anticorpos policlonais IgG marcados com a enzima *Horseradish peroxidase* – Ab<sub>2</sub>-HRP (ab98693) foram obtidos da Abcam.

As soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q (Millipore, 18,2 M $\Omega$ .cm a 25°C, Bedfore, EUA), hidroquinona eo peróxido de hidrogênio 30%, citrato trissódico, N-hidroxisuccinimida (NHS), ácido ferroceno monocarboxílico, ácido 2-etanossulfônico (MES) e etalonamina foram obtidos da Sigma-Aldrich. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foram obtidos da Sigma.

Para filtração das soluções de tampão, foram utilizadas membranas de filtração molecular de 50 kDa da Merck Millipore (Massachusetts, Estados Unidos). As soluções tampão foram preparadas em água: tampão fosfato salino (PBS), pH = 7,4, consistindo de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 2,7 mmol L<sup>-1</sup> e NaCl 137 mmol L<sup>-1</sup> e tampão PBS com Tween 20 0,05% (m/v) (PBS-TW20). O tampão MES foi preparado à 50 mmol L<sup>-1</sup> pH = 5,8.

### 3.2 Materiais e Equipamentos

As medidas de pH da solução de ácido ferroceno monocarboxílico foram realizadas em um pHmetro Digimed modelo DM20, equipado com um eletrodo combinado de vidro Sensoglass SC08. Utilizou-se estufa da marca Nova Ética, as pesagens foram feitas em balança analítica BEL *Engineering*, modelo Mark 210A com precisão de  $\pm 0,1$  mg. Para a realização dos experimentos voltamétricos utilizou-se um multipotenciostato DropSens modelo  $\mu$ stat8000 (Espanha) acoplado a um computador portátil gerenciado pelo software DropView 8400.

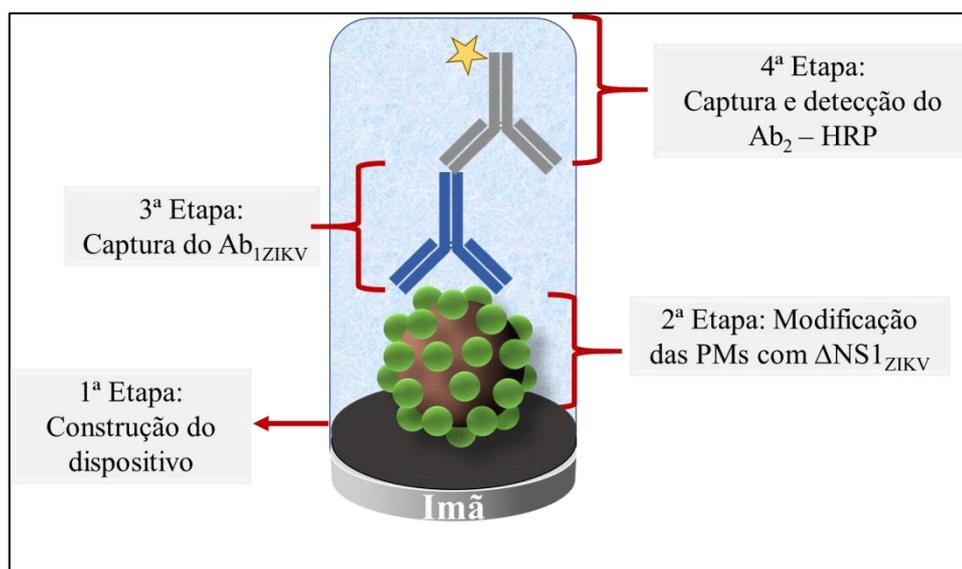
Para a construção dos eletrodos descartáveis, uma impressora de recorte para uso doméstico Silhouette modelo CAMEO foi utilizada, e os desenhos com os contornos dos eletrodos foram construídos utilizando o software Silhouette Studio V4. Vinil adesivo, folhas de poliéster (folha de transparência), usadas como substrato para construção das células eletroquímicas foram obtidos no comércio local. A bomba de seringa (New Era), injetor cromatográfico manual (Rheodyne), tubos e conexões de poliéster-eter-acetona (PEEK) (IDEX Health & Science, Estados Unidos) foram utilizados para na montagem do sistema microfluídico. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas dos equipamentos FEI Inspect F50 e FEI Tecnai G2 F20 X-twin 200KV, respectivamente.

### 3.3 Desenvolvimento do Imunoensaio eletroquímico

#### *3.3.1 Ensaio do tipo sanduíche para determinação do $Ab_{IZIKV}$ utilizando partículas magnéticas e sistema microfluídico*

Este método envolveu a formação de um imunoensaio tipo sanduíche e as etapas estão representadas na Figura 7. Inicialmente o dispositivo foi construído e não houve a modificação da sua superfície. A segunda etapa consistiu no ancoramento da proteína  $\Delta NS1_{ZIKV}$  em partículas magnéticas funcionalizadas

com ácidos carboxílicos, e por fim foram realizadas as etapas capturas e separação do anticorpo  $Ab_{1ZIKV}$  das amostras fortificadas ou amostras de pacientes, seguida da etapa de captura do  $Ab_2$ -HRP, para posterior etapa de adição de solução de hidroquinona e  $H_2O_2$  em canal microfluídico e realização das medidas eletroquímicas.

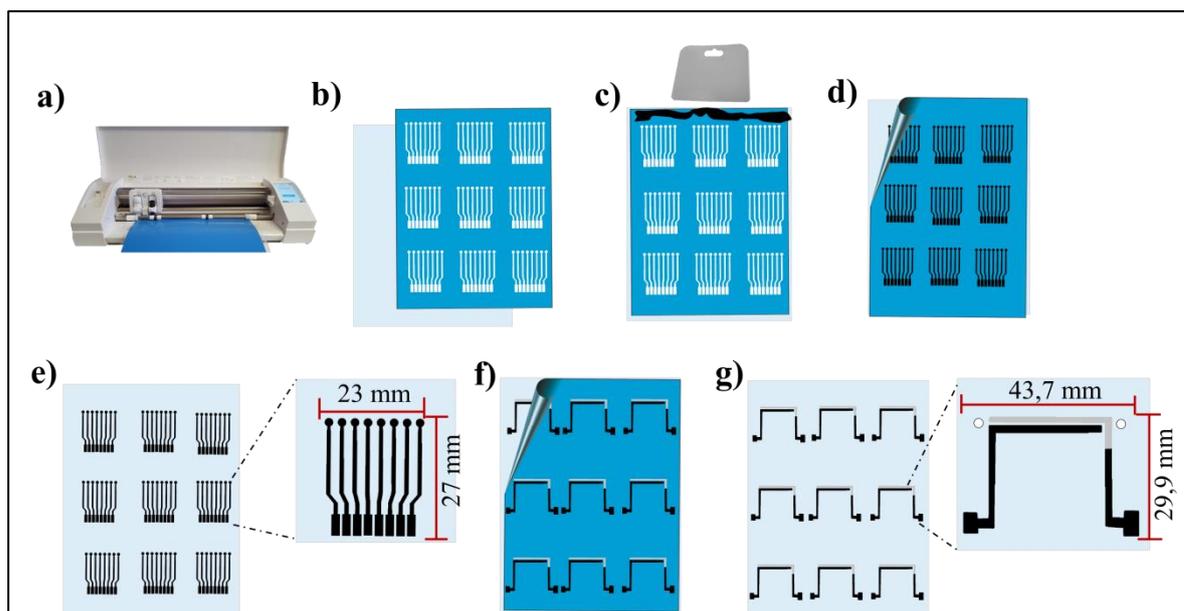


**Figura 6.** Representação esquemática do imunossensaio tipo sanduíche para a detecção do anticorpo  $Ab_{1ZIKV}$  sobre a superfície do WE com um ímã posicionado externamente.

### 3.3.2 Construção dos eletrodos para o dispositivo microfluídico

Inicialmente uma folha de vinil adesivo foi recortada no formato de um arranjo contendo oito eletrodos de trabalho (Figura 7.a). As partes indesejadas do vinil adesivo foram retiradas, formando uma máscara negativa e em seguida, com o vinil já recortado, uma folha adesiva foi aplicada à máscara com a função de permitir a transferência desta para a folha de transparência (Figura 7.b). Após remover o adesivo de transferência, a tinta condutora foi aplicada sobre o vinil recortado aderido a folha de transparência utilizada como substrato e, em seguida, a tinta foi espalhada com auxílio de uma espátula de plástico (Figura 7.c). Em seguida foi condicionado em estufa à  $90^{\circ}C$  durante 30 minutos para o processo de cura da tinta e então, retirado o adesivo de vinil (Figura 7.d).

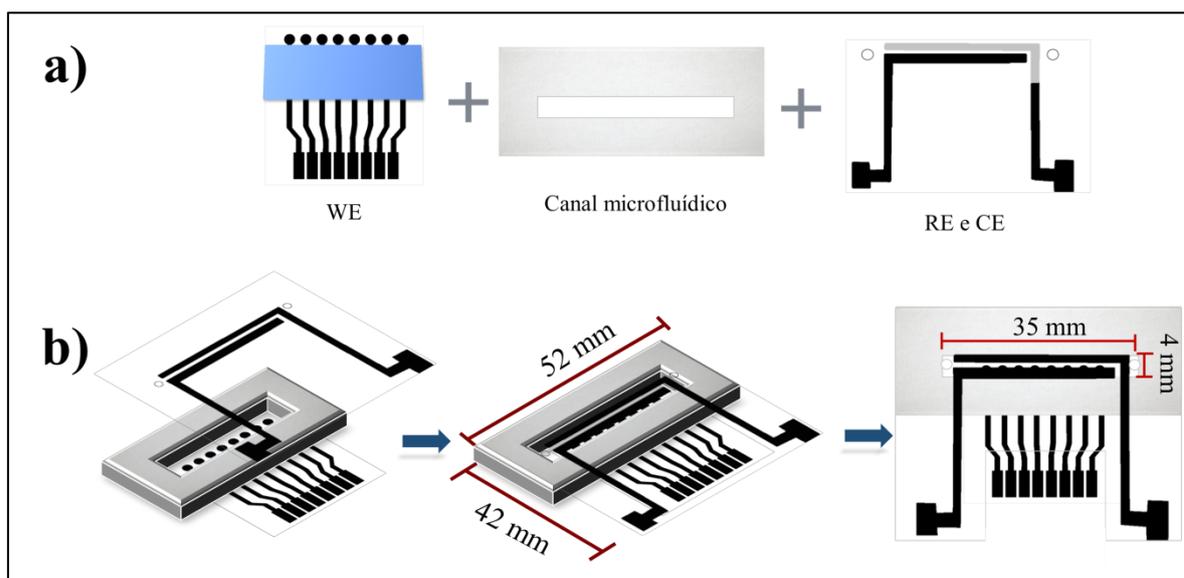
Uma folha de vinil adesivo também foi recortada no formato de eletrodo de referência e contra-eletrodo e as partes indesejadas foram retiradas, formando uma máscara negativa. Uma folha adesiva foi aplicada à máscara com função de permitir a transferência desta para a folha de transparência e após remover o adesivo utilizado como transferidor, a tinta condutora foi aplicada sobre o vinil recortado aderido a folha de transparência e, em seguida, esta foi espalhada com auxílio de uma espátula de plástico. Em seguida foi condicionado também em estufa à 90°C durante 30 minutos para o processo de cura da tinta. Após o processo de cura da tinta de carbono, a tinta de Ag|AgCl foi aplicada sobre o local onde seria o RE e tratado novamente por 30 minutos a 60°C e por último, o adesivo foi removido<sup>86</sup> (Figura 7.f). Os eletrodos de trabalho foram construídos com diâmetro de 2 mm<sup>2</sup> e as dimensões do arranjo e do RE e CE são apresentados nas Figura 7.d e 7.f, respectivamente.



**Figura 7.** Representação esquemática das etapas de fabricação do dispositivo, a) recorte dos arranjos com impressora, b) transferência do adesivo de vinil recortado para folha de transparência, c) aplicação da tinta de carbono, e) retirada do vinil adesivo e dimensões do arranjo, f) aplicação da tinta de Ag|AgCl no eletrodo de pseudo-referência, g) retirada do vinil adesivo após processo de cura e dimensões do dispositivo contendo RE e CE.

Um cartão-dupla face de poliestireno foi recortado em impressora de recorte (F1 suprimentos – Vinyl Cut) de forma a gerar um canal microfluídico que também será utilizado como delimitador da área exposta do WE, com dimensões do canal de 35,0 mm de comprimento por 4,0 mm de largura e 0,4 mm de espessura gerando um volume interno de aproximadamente 56,0  $\mu\text{L}$ , conforme ilustrado na Figura 8.

Na folha de transparência contendo o RE e CE foram feitos dois orifícios nas extremidades do canal microfluídico com a função de entrada e saída de soluções. Aos orifícios de entrada e saída foram fixados dois conectores de poliéter-éter-cetona (Peek) de 0,2 mm, presos com o auxílio de uma fita Command 3M adquirida no comércio local<sup>104</sup>.

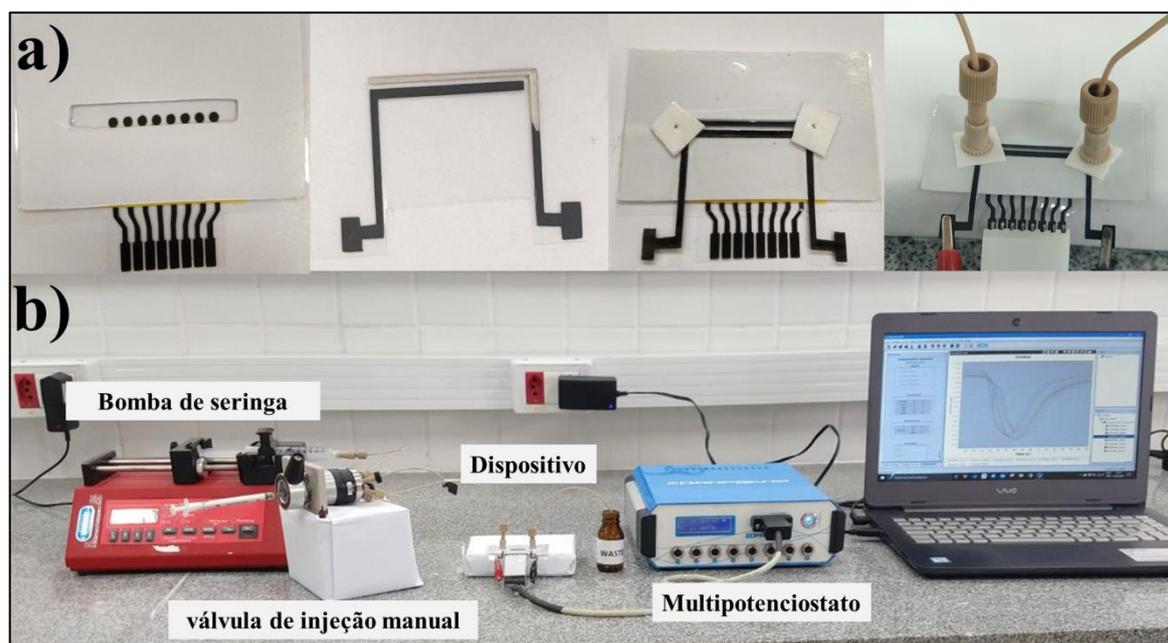


**Figura 8.** Representação esquemática das a) etapas da montagem da célula microfluídica em folhas de transparência seguida de b) colagem do cartão dupla face.

### 3.3.3 Sistema microfluídico

O sistema utilizado consistiu em uma bomba de seringa, utilizada para o carregamento das soluções aquosas para o canal microfluídico, conectado a uma

válvula de injeção manual que estava conectada ao dispositivo microfluídico descartável através de tubo PEEK, como apresentado na Figura 9.



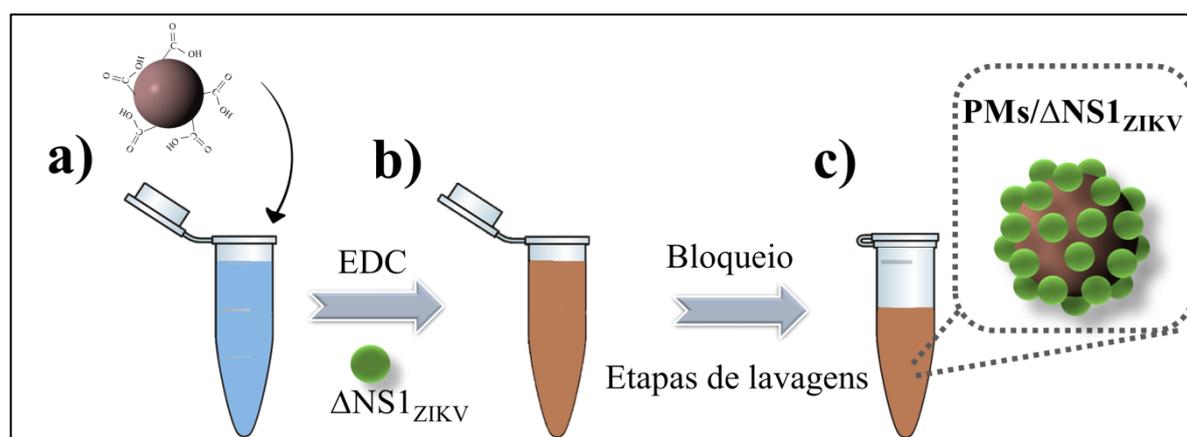
**Figura 9.** a) Da esquerda para direita, arranjo contendo 8 eletrodos de trabalho, contra eletrodo e eletrodo referência, dispositivo acoplado ao injetor manual. b) Sistema microfluídico acoplado a válvula de injeção manual e ao multipotenciostato.

### 3.3.4 Modificação das Partículas Magnética com a proteína $\Delta NS1_{ZIKV}$

A modificação das PMs foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (Polyscience, Inc), no qual 20  $\mu\text{L}$  de PMs comerciais (com diâmetro médio indicado de 1,0  $\mu\text{m}$ ) foram dispersas em 1,0 mL de tampão MES 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 5,8, seguida de separação magnética com auxílio de um suporte magnético. Então adicionou-se uma solução de EDC 10  $\text{mg mL}^{-1}$  recém preparada para ativar os grupamentos carboxilas, e deixado sob leve agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. A dispersão foi então separada magneticamente e lavada com tampão MES<sup>93</sup>.

Adicionou-se uma solução da proteína  $\Delta NS1_{ZIKV}$  à 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparada em PBS em pH 7,4, seguido de leve agitação por 24 horas à temperatura

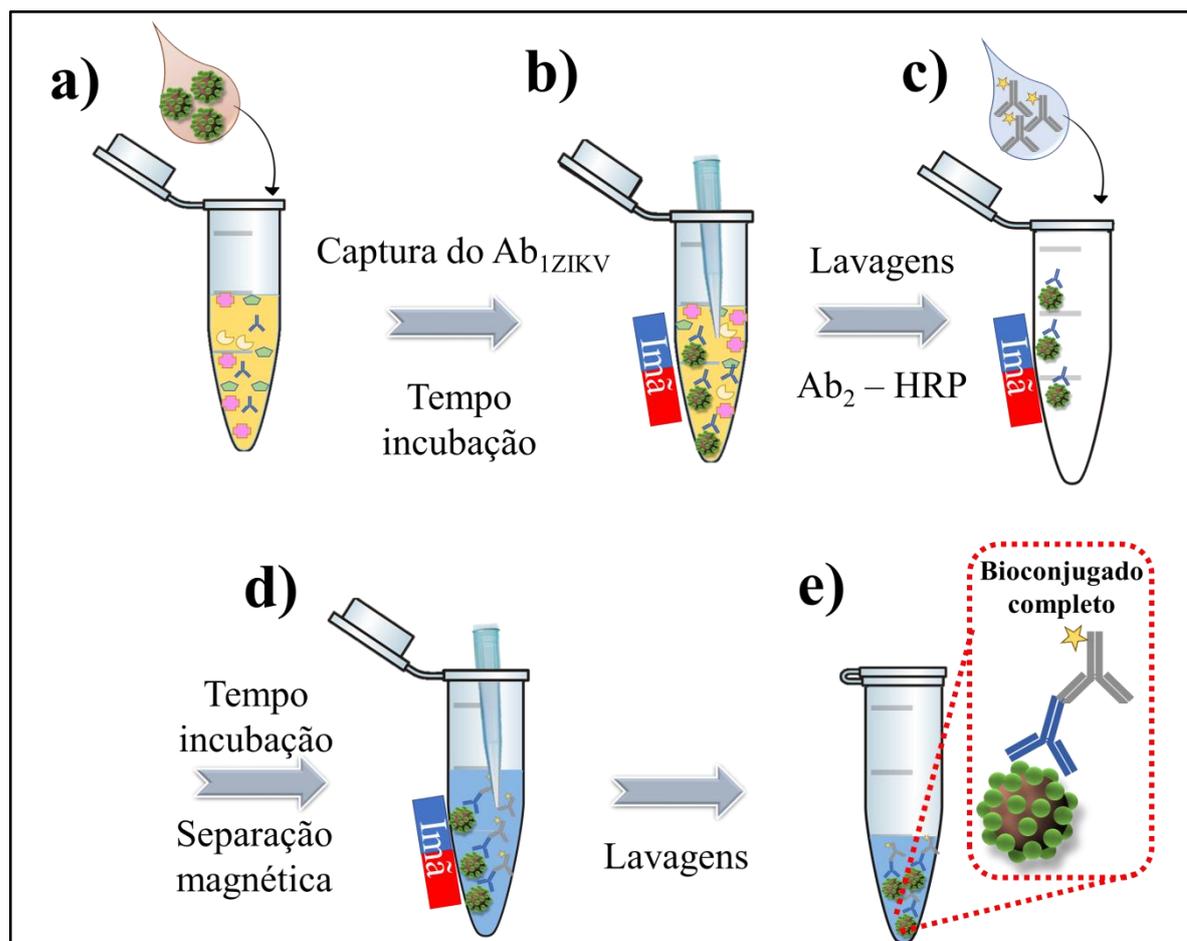
ambiente para formação do bioconjugado PM/ $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub>, conforme apresentado na Figura 10. Após esta etapa, o bioconjugado foi separado magneticamente e lavado três vezes com PBS-TW20 e então ressuspensão em 1,0 mL de etanolamina 1,0 mol L<sup>-1</sup> pH 8,5 a fim de bloquear sítios ativos, evitando ligações não específicas<sup>105,106</sup>. Após 1 hora o bioconjugado foi lavado sucessivamente e então ressuspensão em 500  $\mu$ L de PBS 7,4.



**Figura 10.** Esquema ilustrativo da a) etapa de modificação das PMs contendo grupamentos carboxílicos que foram ativados com EDC, b) incubadas com a proteína  $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub> e após etapas de lavagens c) foram ressuspensas em tampão.

### 3.3.5 Captura do $Ab_{1ZIKV}$ em amostras ou amostras fortificadas

Para o preparo das soluções padrão contendo o biomarcador  $Ab_{1ZIKV}$ , 20  $\mu$ L do bioconjugado PM/ $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub> foram adicionados a 500  $\mu$ L de solução de anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  na concentração desejada em PBS pH 7,4. Esta mistura foi então incubada por 30 minutos em leve agitação à temperatura ambiente, seguida de separação magnética, lavados três vezes com solução PBS-TW20 pH 7,4. Posteriormente, 500  $\mu$ L de uma solução de  $Ab_2$ -HRP à uma concentração de 1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> foi adicionada e deixada em incubação com o bioconjugado PM/ $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub>- $Ab_{1ZIKV}$  por novamente 30 minutos. Em seguida foi separado magneticamente e o sobrenadante descartado. O bioconjugado completo (PM/ $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub>- $Ab_{1ZIKV}$ / $Ab_2$ -HRP) foi ressuspensão em 60  $\mu$ L de PBS pH 7,4, conforme apresentado na Figura 11.



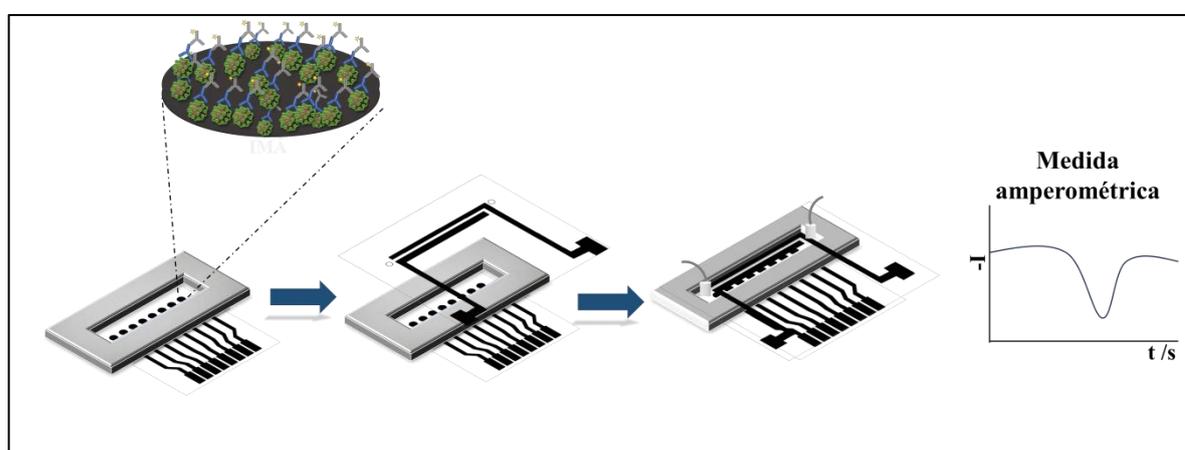
**Figura 11.** Representação esquemática a) Captura do  $Ab_{1ZIKV}$  na amostra fortificada ou amostra de pacientes utilizado o bioconjugado  $PM/\Delta NS1_{ZIKV}$  b) separação magnética e retirada do sobrenadante, c) adição da solução de  $Ab_2-HRP$  d) Separação magnética do bioconjugado contendo  $Ab_{1ZIKV}$  e  $Ab_2-HRP$  e) Ressuspensão do bioconjugado completo.

### 3.4 Detecção do anticorpo $Ab_{1ZIKV}$ via amperometria

Para os ensaios, 5  $\mu L$  da dispersão contendo o bioconjugado completo ( $PM/\Delta NS1_{ZIKV}-Ab_{1ZIKV}/Ab_2-HRP$ ) foi adicionado ao eletrodo de trabalho, contendo um ímã posicionado abaixo do *WE*, visando manter a imobilização magnética dessas partículas sobre a superfície do eletrodo. Após esta etapa, o excesso de solução foi retirado e o dispositivo foi selado para a passagem da solução carreadora de PBS 6,5 permitindo a lavagem do sistema, seguida da

injeção de solução contendo hidroquinona e  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o registro da corrente gerada durante a medida amperométrica como apresentado na Figura 12.

As medidas amperométricas foram realizadas em fluxo, com alça de amostragem de vazão de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  utilizando um multipotenciostato DropSens  $\mu\text{stat 8000}$  (Espanha) conectado ao sistema microfluídico e controlado pelo software Dropview 8400 instalado em computador. As respostas transientes de corrente dos oito eletrodos de trabalho foram obtidas simultaneamente através da utilização da enzima HRP como marcador eletroquímico.



**Figura 12.** Representação esquemática do procedimento para obtenção da resposta transiente de corrente para o imunoenensaio proposto.

### 3.5 Ensaio de Adição e recuperação

Ensaio de adição e recuperação foram realizados utilizando anticorpos padrão de Zika Vírus ( $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$ ) à concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$ . Estes foram incubados em amostra de soro fetal bovino diluído, durante um período 24 horas. Posteriormente, todas as etapas de captura, lavagens até a detecções eletroquímicas foram realizadas como já descrito nas seções 3.3.4 e 3.3.5 e 3.4.

### 3.6 Ensaios de reação cruzada

#### 3.6.1 Ensaios de reação cruzada com anticorpos padrão de Dengue ( $Ab_{IDENV}$ )

Os ensaios de reatividade cruzada foram realizados utilizando anticorpos padrão de Dengue ( $Ab_{IDENV}$ ) e anticorpo  $Ab_{IZIKV}$  (ambos com concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$ ). Os anticorpos foram incubados em soro de fetal bovino diluído e mantidos um intervalo de 24 horas. Posteriormente, todas as etapas de captura, lavagens até a detecção eletroquímica foram realizadas conforme descrito nas seções 3.3.4 e 3.3.5 e 3.4.

#### 3.6.2 Ensaios de reação cruzada com a proteína NS1 da Dengue subtipo 3 ( $DENV3$ )

Ensaios de reatividade cruzada com a proteína NS1  $DENV3$  foram realizados utilizando diferentes concentrações de NS1 na presença do anticorpo  $Ab_{IZIKV}$  à concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  em soro fetal bovino diluído e incubados durante um período 24 horas. Posteriormente, todas as etapas de captura, lavagens até a detecção eletroquímica foram realizadas conforme descrito nas seções 3.3.4 e 3.3.5 e 3.4.

#### 3.6.3 Ensaios de reação cruzada com $Ab_{IDENV}$ e $DENV3$

Ensaios de reatividade cruzada foram realizados utilizando NS1  $DENV3$  à concentração fixa de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  na presença de anticorpos  $Ab_{IDENV}$  em concentração fixada em  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $Ab_{IZIKV}$  à concentração de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$ . Estes foram incubados em amostra de soro fetal bovino diluído, durante um período 24 horas. Posteriormente, todas as etapas de captura, lavagens até a detecções eletroquímicas foram realizadas conforme descrito nas seções 3.3.4 e 3.3.5 e 3.4.

### 3.7 Caracterizações eletroquímicas e estudo de repetibilidade referente a construção dos dispositivos eletroquímicos

A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para caracterização eletroquímica dos arranjos descartáveis. Para isto conectou-se o dispositivo a um multipotenciostato e utilizou-se como sonda eletroquímica o ácido ferroceno monocarboxílico a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  preparado em  $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.8 Amostras de soro de pacientes e amostras fortificadas

As amostras de pacientes foram cedidas pelo Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo coordenado pelo Prof. Edison Luiz Durigon e são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Amostras de soro de pacientes utilizadas neste trabalho

Amostra	Zika vírus	Dengue vírus
Saudável	-	-
18H	+	-
2K	-	+
19K	+	+

As amostras de soro humano foram coletadas de pessoas residentes na cidade de São Paulo, com protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP—CEPSH (CEPSH - Off.011616) e foram confirmadas como positivas para ZIKV por PCR em tempo real. Para as medidas eletroquímicas, as amostras de soro humano foram diluídas 5200 vezes em tampão PBS  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4.

As amostras fortificadas foram preparadas em PBS 7,4, ou soro de fetal bovino diluído cinco vezes em PBS 7,4 por meio da adição de anticorpos Ab<sub>1ZIKV</sub> e/ou Ab<sub>1DENV</sub>.

### 3.9 Fragmento da Proteína $\Delta$ NS1 recombinante do ZIKV

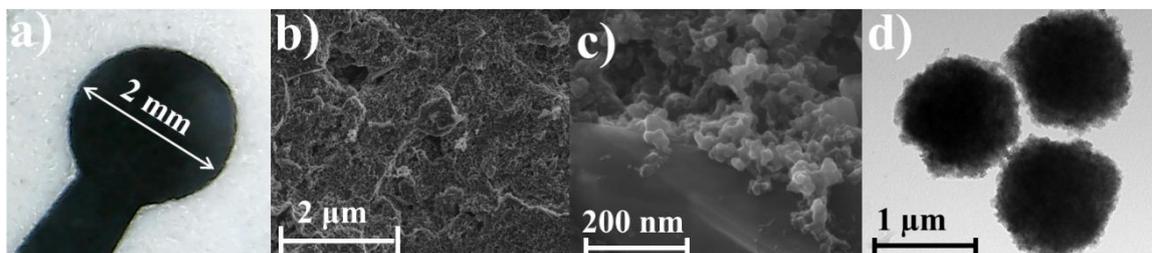
É descrito na literatura que há reatividade cruzada entre a proteína NS1 da Dengue e Zika<sup>77</sup>. Para contornar isso foi desenvolvida, em sistema procarioto, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo coordenado pela Prof. Dr. Luís Carlos Ferreira, uma proteína  $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub> recombinante com tamanho de aproximadamente 17,5 kDa, que foi utilizada em testes na plataforma ELISA para detecção de anticorpos IgG desenvolvida pelo referido laboratório em conjunto com o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB/USP<sup>107</sup>. A validação destes testes, foram utilizados soros de pacientes vacinados contra febre amarela e positivos para dengue obtendo-se uma especificidade de 94%<sup>108</sup>.

Logo, acredita-se que as proteínas  $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub> recombinantes de Zika que estão sendo aplicadas apresentam características imunológicas e estruturais preservadas em relação à proteína nativa e as mesmas podem ser aplicadas nos dispositivos propostos<sup>109</sup>.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica dos eletrodos e PMs utilizadas e caracterização eletroquímica do dispositivo construído

Os eletrodos construídos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O eletrodo de trabalho apresenta um diâmetro de 2 mm (Figura 13.a) e as imagens obtidas da superfície do eletrodo apresentaram morfologia rugosa típica de eletrodos a base de tinta de carbono<sup>110</sup> (Figura 13.b e 13.c). A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das partículas magnéticas comerciais, apresentada na Figura 13.d, demonstram que as mesmas apresentam morfologia esférica e rugosa<sup>94</sup>.



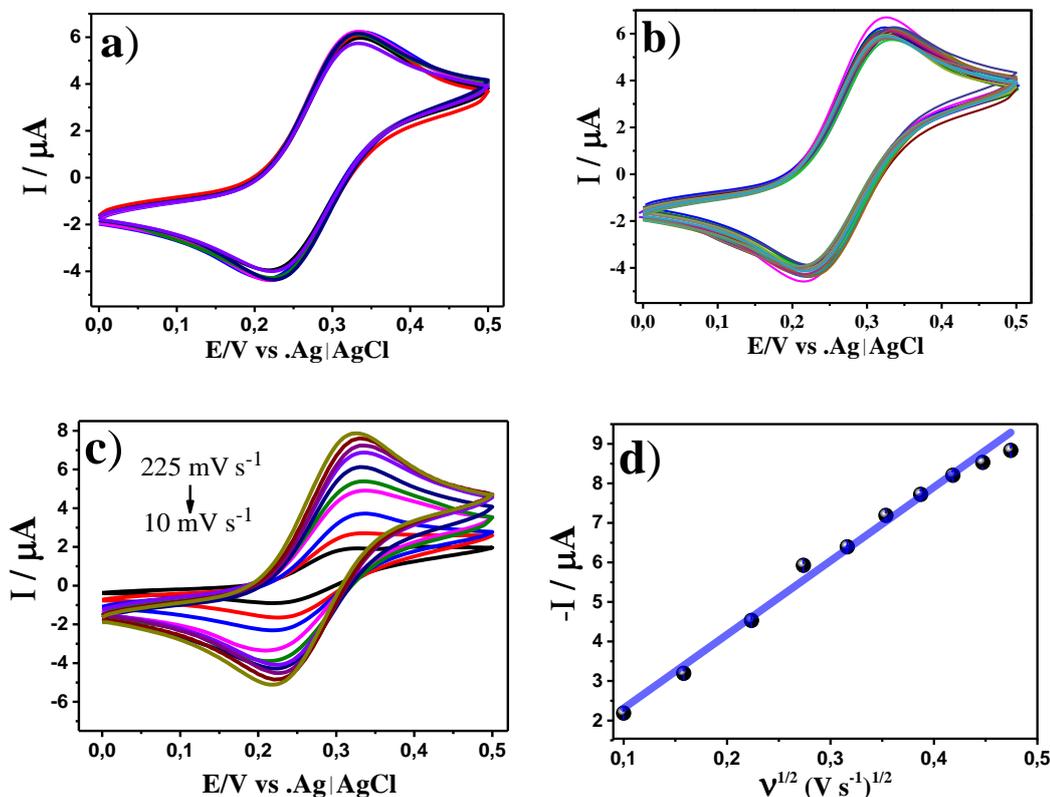
**Figura 13.** Imagens de a) eletrodo de trabalho, b) e c) MEV da superfície do eletrodo de trabalho, d) Imagem de MET das partículas magnéticas *Dynabeads MyOne Carboxylic Acid* sem ancoramento da proteína  $\Delta$ NS1<sub>ZIKV</sub>.

Para as caracterizações eletroquímicas, utilizou-se um dispositivo microfluídico contendo um arranjo contendo oito eletrodos de trabalho, um contra eletrodo e um eletrodo de pseudo-referência.

O estudo de repetibilidade intra-arranjo utilizando uma sonda de ácido ferroceno monocarboxílico foi realizado (Figura 14.a), empregando um arranjo contendo oito eletrodos de trabalho. Observou-se que estes eletrodos de trabalho contidos no arranjo geraram perfis de picos anódicos similares e com coeficiente de variação entre os mesmos, igual a 4,0 %, indicando uma boa precisão.

Também foram realizados estudos de repetibilidade inter-arranjos, (Figura 14.b), no qual um total de três dispositivos ( $n=24$ ) foram avaliados e obteve-se um coeficiente de variação inferior a 5,0%. Esses resultados demonstram que os diferentes arranjos de eletrodos apresentaram resposta similar com boa precisão.

Também foram observados que os potenciais de pico de oxidação e redução (Figura 14.c) do sistema de estudo permaneceram inalterados com diferentes velocidades de varredura (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 e 225  $\text{mVs}^{-1}$ ). Buscando-se avaliar os processos que ocorrem na superfície do eletrodo, e baseando-se na equação Randles-Sevcik, um gráfico da corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, é apresentado na Figura 14.d. As respostas de corrente obtidas apresentaram valores crescentes com perfil linear oriunda do pressuposto que a aplicação de taxas de varredura mais rápidas levam a uma diminuição no tamanho da camada de difusão, como consequência, são observados correntes de pico anódicos e catódicos mais elevados<sup>111</sup>.



**Figura 14.** Perfis voltamétricos da a) avaliação de repetibilidade inter-arranjo, b) repetibilidade intra-arranjo, c) aplicação de diferentes velocidades de varredura e d) Variação da corrente de pico anódico em função do quadrado da velocidade de varredura. Sonda ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L<sup>-1</sup>.

## 4.2 Detecção dos anticorpos Ab<sub>1ZIKV</sub> via amperometria utilizando enzima HRP como marcador eletroquímico

As respostas transientes de corrente foram obtidas através da enzima HRP como marcador eletroquímico, por meio do mecanismo apresentado nas equações (3) à (5)<sup>112</sup>. Na equação 3, ocorre a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela enzima HRP, formando assim um oxo complexo HRP(Fe<sup>IV</sup>)=O. Após esta etapa, esse oxo complexo é regenerado na presença do mediador eletroquímico, a HQ, é então oxidada a benzoquinona (BQ), conforme equação 4. Posteriormente a BQ é reduzida eletronicamente na superfície do eletrodo, aplicando-se um potencial fixo de -0,2 V vs Ag | AgCl, na transferência de dois prótons e dois elétrons<sup>72</sup>, (Equação 5). A corrente gerada devido a redução da benzoquinona é proporcional a concentração do anticorpo Ab<sub>1ZIKV</sub> na solução.



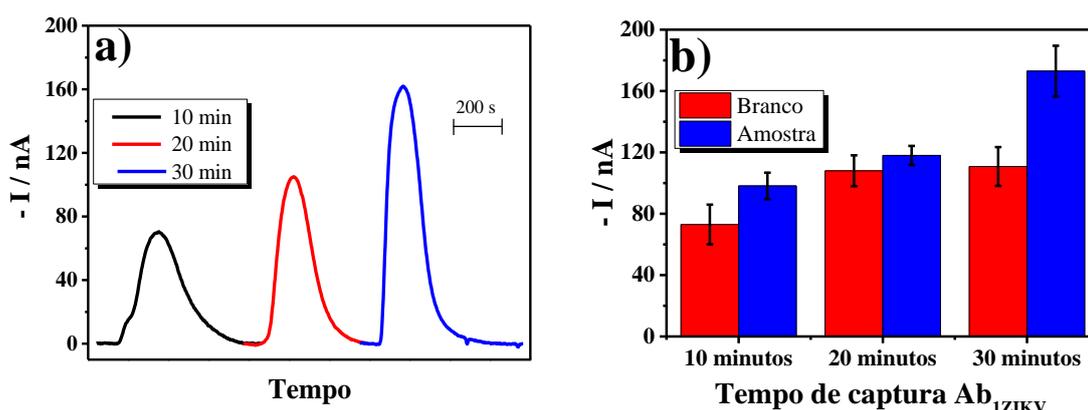
## 4.3 Otimização das condições experimentais

### 4.3.1 Estudo do Tempo de incubação do anticorpo Ab<sub>1ZIKV</sub> com as PMs modificadas com ΔNS1<sub>ZIKV</sub>

O tempo de incubação entre as PM-ΔNS1<sub>ZIKV</sub> e a amostra contendo o Ab<sub>1ZIKV</sub> é um importante parâmetro para a formação do imunocomplexo em uma extensão que permita a quantificação do analito. Assim, três tempos de incubações foram avaliados para a formação do biconjugado PM-ΔNS1<sub>ZIKV</sub>

/Ab<sub>1ZIKV</sub> sendo de 10, 20 e 30 minutos em solução padrão preparada em tampão PBS 7,4.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15.a e b. O maior sinal de corrente foi obtido com o tempo de 30 minutos (Figura 15.b), podendo ser um indicativo que a interação entre o antígeno e anticorpo ocorreu em extensão suficiente para a realização do imunoenensaio. Além disto, neste tempo foi obtido uma melhor diferenciação entre a resposta do branco (somente PBS 7,4) e da amostra. Com isso, para os ensaios futuros, o tempo de incubação selecionado foi de 30 minutos para captura do Ab<sub>1ZIKV</sub> na amostra. Tempos maiores do que 30 minutos não foram avaliados, uma vez que o tempo total de análise poderia torna-se longo.

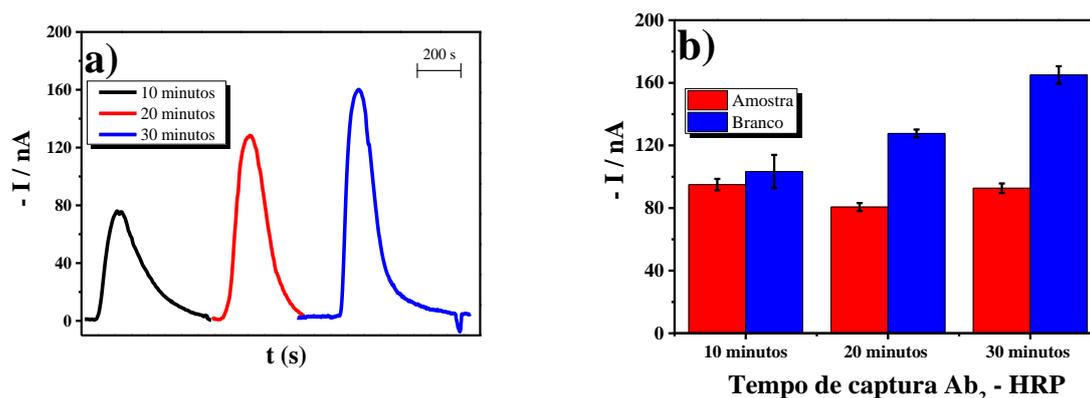


**Figura 15.** a) Sinais transientes de corrente obtidos para Ab<sub>1ZIKV</sub> à 480,0 pg mL<sup>-1</sup> em diferentes tempos de incubações. Injeção de solução carreadora de PBS 6,5 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e HQ 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. Potencial aplicado de -0,2 V. b) Média das correntes em diferentes tempos de incubação e seus respectivos brancos, ( $n \geq 4$ ).

#### 4.3.2 Tempo de incubação do anticorpo Ab<sub>2</sub> – HRP

O tempo de incubação para a adição de Ab<sub>2</sub>-HRP também foi avaliado, igualmente ao estudo de incubação do Ab<sub>1ZIKV</sub>. Semelhantemente, ao estudo anterior e aos trabalhos já publicados na literatura<sup>92,113,114</sup>, o tempo de 30 minutos, foi suficiente para a formação do imunocomplexo final (Figura 16.b).

Assim este tempo também foi selecionado para ensaios futuros. Tempos maiores que estes também não foram avaliados, uma vez que na literatura já é relatado que tempos maiores, a corrente transiente pode permanecer constante devido à saturação no complexo antígeno-anticorpo<sup>94</sup>, além de tornar longo o tempo total de análise.



**Figura 16.** a) Sinais transientes de corrente obtidos para Ab<sub>1ZIKV</sub> à 480,0 µg mL<sup>-1</sup> em diferentes tempos de incubações. Injeção de solução carreadora de PBS 6,5 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e HQ 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. Potencial aplicado de -0,2 V. b) Valores de média das correntes em diferentes tempos de incubação e seus respectivos brancos, (n ≥ 4).

#### 4.4 Curva Analítica

Para a construção da curva analítica, foi utilizado um dispositivo contendo oito eletrodos de trabalho para cada concentração estudada e descartado após o uso. As etapas de captura, separação, pré-concentração e detecção para a construção da curva de calibração foram realizadas em soluções padrão compostas pelo anticorpo Ab<sub>1ZIKV</sub> diluído em PBS, pH 7,4 em diferentes concentrações.

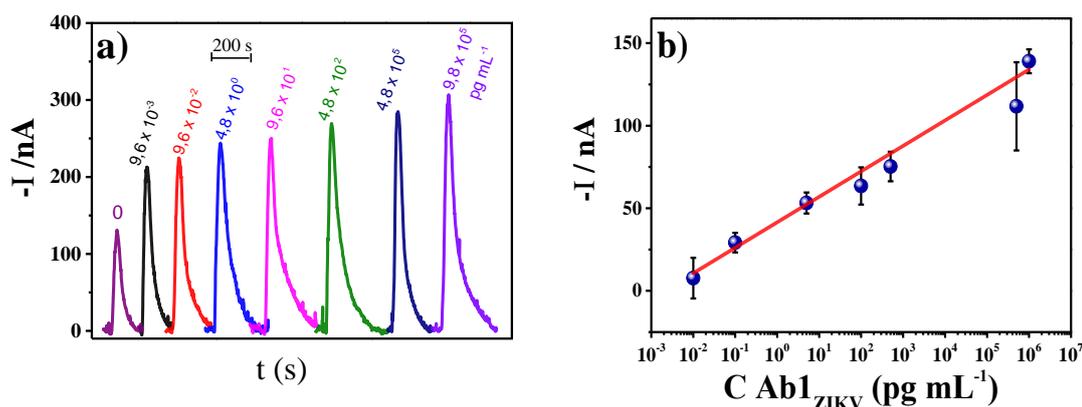
A curva analítica obtida é apresentada na Figura 17, no qual os valores do branco foram descontados dos valores transientes de correntes obtidos nas diferentes concentrações. Pode-se observar que os valores de corrente transientes obtidos apresentaram uma resposta linear com logarítmico da

concentração dos anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$ , conforme apresentado na Figura 17.b bem como previsto na literatura<sup>77,78</sup>.

Uma ampla faixa linear entre  $0,01$  a  $9,8 \times 10^5$   $pg\ mL^{-1}$  foi obtida com equação de reta de  $I_p(\mu A) = 0,04 + 0,01 C\ Ab_{1ZIKV}$  e coeficiente de correlação de  $0,981$ . Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de  $0,48\ pg\ mL^{-1}$  e  $1,45\ pg\ mL^{-1}$  foram obtidos respectivamente. Os parâmetros de LD e LQ foram calculados segundo recomendações da IUPAC<sup>115</sup>.

$$LOD = \frac{3,3 \times SD_{brancos}}{\text{inclinação da reta}} \quad LQ = \frac{10 \times SD_{brancos}}{\text{inclinação da reta}}$$

No qual SD é o desvio padrão referente a 10 medidas de brancos dividida sobre a inclinação da reta referente à curva analítica obtida.



**Figura 17.** a) Respostas transientes de corrente obtidas para o branco e em diferentes concentrações de  $Ab_{1ZIKV}$ , solução de detecção PBS 6,5 contendo  $H_2O_2$   $1,0\ mmol\ L^{-1}$  e HQ  $2,0\ mmol\ L^{-1}$ . b) Curva analítica obtida para o biomarcador  $\Delta NS1_{ZIKV}$ , ( $n \geq 4$ ).

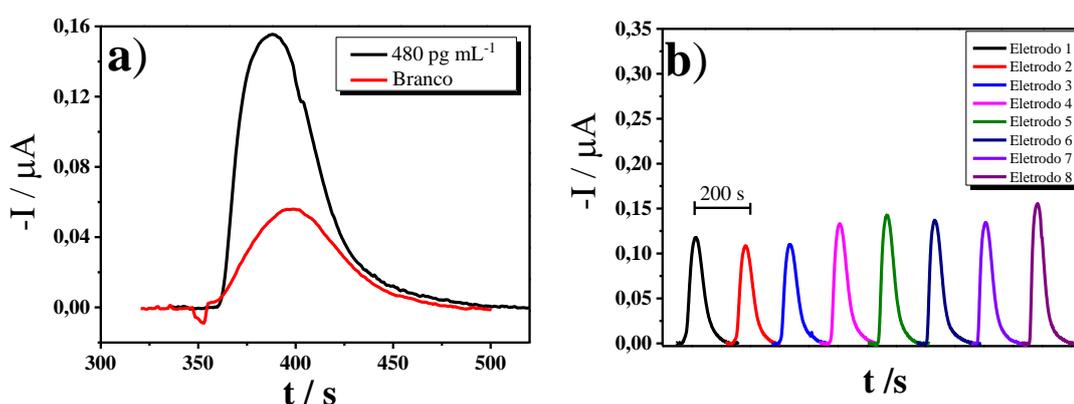
O tempo total do imunoenensaio desenvolvido contabilizando as etapas de captura do biomarcador, formação do bioconjugado e detecção eletroquímica foi de aproximadamente 70 minutos.

#### 4.5 Estudo de repetibilidade

Neste estudo, as etapas de captura, separação, pré-concentração e detecção foram realizadas em soluções padrão compostas pelo biomarcador diluído em diferentes concentrações em soro fetal bovino diluído em PBS 7,4.

É possível observar a diferença entre a resposta do branco e de uma concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  de  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$ , conforme apresentado na Figura 18.a.) Os valores de corrente transientes obtidas nos brancos podem ser atribuídos a possíveis ligações não específicas presentes na partícula magnética decorada como também pelo processo redox do mediador eletroquímico e substrato sobre a superfície do eletrodo<sup>94</sup>.

O estudo de repetibilidade é apresentado no item b) da figura obtido um valor de RSD de 8%, sendo considerado bom valor, uma vez que para ensaios biológicos, são aceitos desvios de até 20%<sup>116</sup>, demonstrando assim boa repetibilidade do mesmo. Estudos de repetibilidade intra-dia utilizando diferentes arranjos ( $n=15$ ) e inter-dia ( $n=31$ ) foram realizados. Os valores de RSD% obtidos foram 7 e 10 % respectivamente, demonstrando assim boa repetibilidade com limites de desvios também aceitos para ensaios biológicos<sup>116</sup>.



**Figura 18.** a) Respostas transientes obtidos para a  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  e branco com a injeção de uma mistura de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  e  $2,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ HQ}$ . Potencial aplicado:  $-0,2 \text{ V}$ . b) Sinais transientes do biomarcador  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  obtidos simultaneamente para um arranjo microfluídico, ( $n \geq 4$ ).

#### 4.6 Ensaio de Adição e Recuperação

Visando avaliar a exatidão do método proposto, testes de adição e recuperação foram realizadas em amostras de soro fetal bovino diluído, uma vez que se trata de uma matriz complexa e semelhante ao soro humano. Três níveis de fortificações foram avaliados:  $1,90 \text{ pg mL}^{-1}$ ,  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $480,0 \times 10^3 \text{ pg mL}^{-1}$ , correspondentes aos pontos extremos e central da curva analítica, os resultados são apresentados na Tabela 2.

As porcentagens de recuperação variaram entre 99,5 à 104,0%, demonstrando boa exatidão para o método desenvolvido, uma vez que os resultados estão de acordo os valores de recuperação aceitáveis para ensaios biológicos<sup>117</sup>.

**Tabela 2.** Estudo de adição e recuperação a partir de soro fetal bovino diluído e fortificado em diferentes concentrações de anticorpos  $\text{Ab}_{\text{IZIKV}}$ ,  $n \geq 4$ .

Adicionado ( $\text{pg mL}^{-1}$ )	Encontrado ( $\text{pg mL}^{-1}$ )	Recuperado (%)
1,90	$1,9 \pm 0,1$	99,5
480,0	$463,0 \pm 0,1$	104,0
$480,0 \times 10^3$	$480,0 \times 10^3 \pm 10 \times 10^3$	98,0

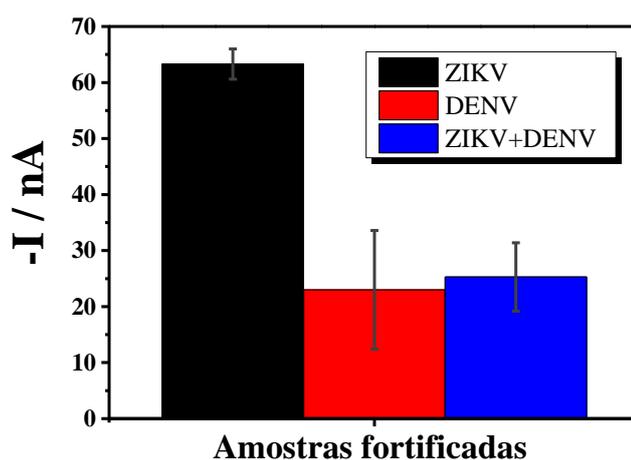
#### 4.7 Avaliação da reação cruzada

A reação cruzada tem sido tradicionalmente um grande problema em sorodiagnóstico de *flavivírus*, devido ao seu alto grau de homologia entre anticorpos e com a proteína NS1 de ambos<sup>118,119</sup>. Estes eventos podem ocorrer, especialmente em regiões em que diferentes tipos de *flavivírus* co-circulam e a imunidade pré-existente em relação a pelo menos a um dos membros do gênero podem ser frequentemente um fator de confusão no diagnóstico sorológico<sup>120</sup>, levando a resultados falsos-positivos e/ou falsos negativos<sup>41,42,118,121</sup>. Por esse

motivo, estudos utilizando o anticorpo  $Ab_{IDENV}$  bem como a proteína NS1 da Dengue subtipo 3 (NS1 DENV3) foram incluídos neste trabalho, de modo a avaliar essa possível interferência.

#### 4.7.1 Ensaios de reação cruzada com anticorpos padrão de Dengue ( $Ab_{IDENV}$ )

Para este estudo, realizou-se imunoenaios em amostras contendo apenas anticorpos ZIKV, outro somente com anticorpos DENV e uma terceira com ambos os anticorpos nas concentrações fixas de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  em soro fetal bovino diluído. Na Figura 19 são apresentados os valores médios de corrente obtidos. Os testes indicaram que ocorreram reatividade cruzada na amostra simulando um soro de paciente em que esteve em contato com as duas doenças (barra em azul), ou seja, contendo os anticorpos  $Ab_{IDENV}$  e  $Ab_{IZIKV}$ , uma vez que foi observado uma diminuição de aproximadamente 41,0% do sinal obtido quando comparado em análises realizadas somente com o anticorpo  $Ab_{IZIKV}$  (barra em preto).

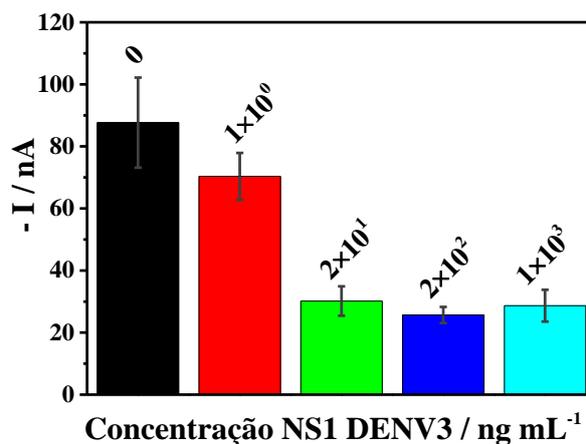


**Figura 19.** Avaliação da reação cruzada de anticorpos  $Ab_{IDENV}$  na detecção de anticorpos  $Ab_{IZIKV}$  em amostras de soro fetal bovino fortificado. Concentração de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  para ambos anticorpos utilizados. Valores de branco já descontados, ( $n \geq 4$ ).

#### 4.7.2 Ensaio de reação cruzada com a proteína NS1 da Dengue tipo 3 (DENV3)

Buscando-se também confirmar se há reação cruzada entre os anticorpos para ZIKV com a proteína NS1 da Dengue, um outro imunoensaio foi realizado. Foram adicionados simultaneamente a proteína NS1 DENV3 livre e  $Ab_{1ZIKV}$  em soro fetal bovino diluído, para posteriormente serem realizados os imunoenaios na presença da  $PM/\Delta NS1_{ZIKV}$ . A proteína NS1 DENV3 foi utilizada em diferentes concentrações, (1, 20, 200, 1000 ng mL<sup>-1</sup>) tendo como base trabalhos na literatura<sup>122</sup>, no entanto, é válido ressaltar que a concentração tanto de anticorpos como da proteína NS1 pode variar dentro de uma mesma população<sup>74,122,123</sup>.

Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 20, no qual observa-se que quanto maior a concentração de NS1 DENV3 no meio, uma diminuição no sinal da corrente transiente é obtida. Esta diminuição do sinal pode ser atribuída à interação dos anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  com a proteína NS1 DENV3 livre. Consequentemente, na etapa de captura com a  $PM/\Delta NS1_{ZIKV}$ , menos anticorpos  $Ab_{1ZIKV}$  estarão disponíveis para esta interação, diminuindo assim o sinal. No entanto, este tipo de comportamento já foi relatado em demais trabalhos da literatura<sup>119,124</sup>.



**Figura 20.** Resultados de corrente média obtidas em amostras contendo uma concentração fixa de  $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$  de anticorpos  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  e diferentes concentrações da proteína NS1 DENV3 preparadas em soro fetal bovino diluído, ( $n \geq 4$ ).

#### 4.7.3 Ensaios de reação cruzada com $\text{Ab}_{1\text{DENV}}$ e DENV3

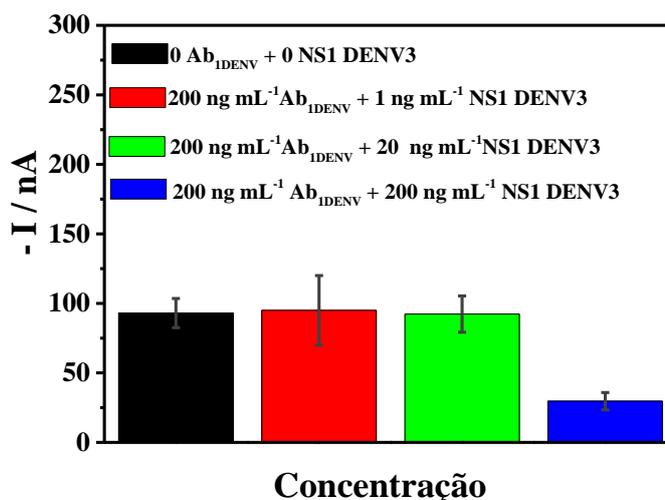
Com ainda não existe um consenso sobre um valor de corte para a concentração de anticorpos específicos tanto para Dengue como para Zika em pacientes infetados<sup>125</sup>, um novo imunoenensaio foi realizado. Nestes imunoenensaio, manteve-se um valor fixo do anticorpo  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  ( $480,0 \text{ pg mL}^{-1}$ ) como controle e as demais amostras fortificadas com uma concentração constante de  $\text{Ab}_{1\text{DENV}}$  ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (aproximadamente 400 vezes maior do que  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$ ).

Com estas espécies em concentração fixa, adicionou-se a proteína NS1 DENV3 livre em diferentes concentrações adicionou-se a XX e aplicou o imunoenensaio para detecção de anticorpos para Zika, simulando assim uma situação em que o paciente apresente a presença de  $\text{Ab}_{1\text{ZIKV}}$  e  $\text{Ab}_{1\text{DENV}}$ , expressando mais os anticorpos e proteína para a Dengue<sup>75</sup>. Os resultados são apresentados na Figura 21, no qual observa-se que mesmo na presença de

elevadas concentrações do anticorpo específico/seletivo para Dengue e da proteína NS1 DENV3, houve a detecção do anticorpo para Zika vírus.

Apenas na proporção 1:1 de  $ab_{IDENV}$  e NS1 DENV3 (Figura 21, barra em azul) houve um decréscimo no sinal de corrente de aproximadamente 31,0 % em comparação ao ensaio sem a presença destes (barra em preto). Este resultado pode ser atribuído a uma elevada concentração da proteína NS1 DENV3, levando-se a uma reatividade cruzada entre anticorpos  $Ab_{IZIKV}$ , diminuindo-se assim o sinal obtido.

Também é possível inferir-se que a utilização do anticorpo  $Ab_{IDENV}$  pode ajudar a evitar reações cruzadas oriundas da presença de NS1 DENV3 livre, podendo diminuir assim a presença de resultados falsos positivos e falsos negativos no imunoenensaio proposto.



**Figura 21.** Valores médios de correntes transiente obtidos para detecção do anticorpo  $Ab_{IZIKV}$  em soro fetal bovino diluído. Concentração fixa de  $Ab_{IDENV}$  200  $ng\ mL^{-1}$  e de  $Ab_{IZIKV}$  em 480,0  $pg\ mL^{-1}$ , com variação de concentrações de NS1 DENV3. Valores de branco já descontado, ( $n \geq 4$ ).

#### 4.8 Aplicação do imunoenensaio em amostras de pacientes

Por fim, foram realizados imunoenensaio em amostras de pacientes cedidas pelo ICB/USP para o desenvolvimento deste trabalho. Na Figura 22a, são

apresentados valores médios de corrente para diferentes amostras de pacientes. Percebe-se que, com o imunoenensaio realizado, houve uma elevada diferenciação entre o paciente infectado apenas com Zika (+ZIKV, Figura 22a, barra em verde) do indivíduo saudável (barra em preto) e do paciente com apenas dengue (+DENV, barra em vermelho), indicando, que neste caso, que a reação cruzada não foi proeminente, o que pode ser indício de elevada especificidade do fragmento da proteína  $\Delta\text{NS1}_{\text{ZIKV}}$  utilizada.

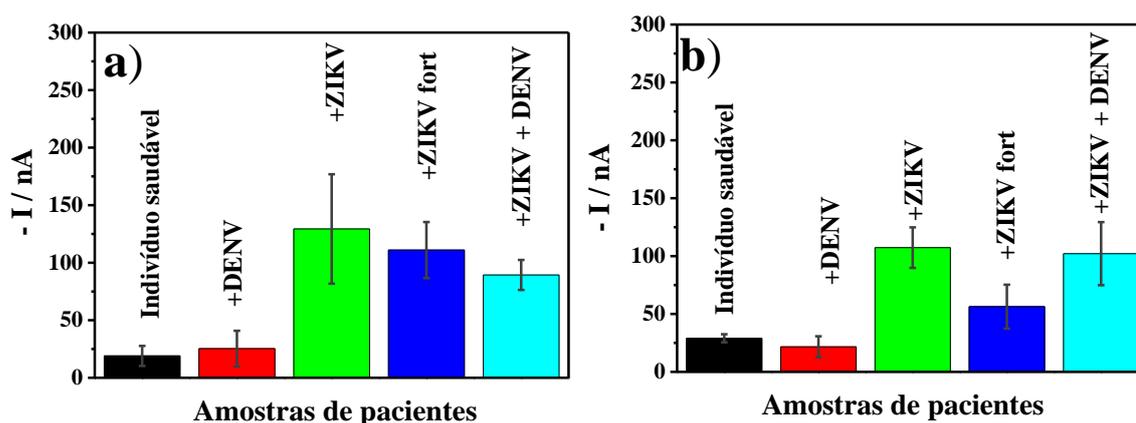
A amostra positiva para Zika vírus também foi fortificada com  $\text{Ab}_{\text{DENV}}$  à  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  buscando-se avaliar se no imunoenensaio haveria reatividade cruzada entre os anticorpos (+ZIKV<sub>fort</sub>). De acordo com dados apresentados na Figura 22a, a amostra +ZIKV<sub>fort</sub> (barra em azul) apresentou pequena diminuição de corrente (decréscimo de  $\cong 15 \text{ nA}$ ), quando comparado a amostra positiva para Zika sem a adição do  $\text{Ab}_{\text{DENV}}$  (barra em verde) indicando assim que não ocorreu reação cruzada significativa nesta amostra.

Quando compara-se os valores de correntes da amostra de soro +ZIKV (barra em verde) e +ZIKV<sub>fort</sub> (barra em azul) aos valores obtidos para amostra de paciente infectado com Dengue e Zika vírus (+ZIKV + DENV, barra em ciano), apresentados na Figura 22a, percebe-se que os valores são relativamente próximos (levando-se em consideração os desvios nas medidas), logo, a aplicação deste imunoenensaio, poderia ser indicado aos pacientes em que, eventualmente, já estiveram em contato com Zika vírus e Dengue. No entanto, deve-se levar em conta que o número de voluntários neste estudo é muito pequeno, sendo necessário de um número maior de amostras para uma avaliação mais efetiva.

Como já comentado, a presença da proteína NS1 DENV3 pode levar a reação cruzada com os anticorpos específicos do Zika<sup>118,120,124</sup>. Visando reduzir os riscos das reações cruzadas na análise de amostras de pacientes, foi acrescentada uma etapa adicional aos ensaios. Antes de serem feitas as medidas eletroquímicas para a detecção dos anticorpos  $\text{Ab}_{\text{ZIKV}}$ , ao soro sanguíneo

diluído dos pacientes, foi adicionada a proteína NS1 DENV3 à uma concentração fixa  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , com o objetivo de avaliar o efeito desta nas respostas do imunoenensaio (Figura 22b). Esta concentração foi escolhida de acordo com o estudo apresentado na Figura 21, no qual observou-se que essa concentração foi suficiente para evitar a reação cruzada nas amostras fortificadas.

Os valores médios de corrente obtidos quando houve a adição da proteína NS1 DENV3 aos imunoenaios são apresentados na Figura 22b. Percebe-se que, para estas amostras avaliadas, a adição de NS1 DENV3 pode não ser necessária, uma vez que os valores de corrente variaram pouco, e quando comparados aos valores apresentados na Figura 22a, sendo apenas a amostra positiva para Zika vírus fortificada (barra em azul, Figura 22b) apresentou declínio no sinal de corrente transiente obtido, o que pode novamente ser atribuído a reações cruzadas, ou seja, todo o anticorpo  $\text{Ab}_{\text{DENV}}$  interagiu com a NS1 DENV3 e eventualmente parte dos anticorpos  $\text{Ab}_{\text{ZIKV}}$  também interagiram, diminuindo assim o sinal analítico.



**Figura 22.** Valores transientes de correntes obtidos para detecção do anticorpo  $\text{Ab}_{\text{ZIKV}}$  em a) amostras de pacientes com ZIKV e/ou DENV diluídos 5200 vezes em PBS 7,4 b) adição da proteína NS1 DENV3 à  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ , valores de branco já descontado, ( $n \geq 4$ ).

De maneira geral, os resultados demonstraram a capacidade do imunoensaio de ser aplicado em análises de Zika vírus. A reação cruzada nas amostras de pacientes que foram avaliados neste trabalho não prejudicou significativamente a diferenciação de anticorpos específicos para o ZIKV com os da DENV. O imunoensaio desenvolvido apresentou boa resposta para amostras de soro positivos para ZIKV bem como uma boa especificidade, indicando a potencialidade do método desenvolvido para ao diagnóstico rápido e de baixo custo da ZIKV.

## 5. CONCLUSÕES

Uma sorologia confiável para o monitoramento e/ou diagnóstico da infecção pelo ZIKV continua sendo um desafio para as tecnologias atuais, no entanto, apesar do pequeno número amostras, demonstrou-se a viabilidade de medir os níveis de anticorpo  $Ab_{\text{ZIKV}}$  em soro humano, utilizando uma plataforma microfluídica..

Uma ampla faixa linear foi obtida, variando na escala de concentração de  $\text{pg mL}^{-1}$  até  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , além de um baixo limite de detecção. Também foi observado boa repetibilidade do sistema desenvolvido, obtendo-se desvios abaixo de 15%, que são desvios aceitos em imunoenaios biológicos.

A aplicação dos imunoenaios em amostras de pacientes demonstraram que eventos de reação cruzada não prejudicou significativamente a diferenciação de anticorpos para o ZIKV com os da DENV, indicando ser uma ferramenta promissora na detecção de anticorpos para o Zika vírus, apresentando um baixo limite de detecção.

A metodologia desenvolvida apresenta vantagens quando comparados ao ELISA tais como: a necessidade de pequeno volume de amostras e reagentes, análise rápida e de baixo custo, apresentando um valor aproximado de R\$ 0,70 reais por dispositivo, este valor está associado aos pequenos volumes de reagentes utilizados bem como o emprego de materiais simples, como cartão dupla face, folhas de poliéster, dentre outros para a construção dos dispositivos totalmente descartáveis.

## 6. REFERÊNCIAS

1. DICK, G. W. A.; Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**(5),521-534, 1952.
2. CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M.; Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Rev. Microbiol.* **44**,649-688, 1990.
3. HAYES, E. B.; Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**(9),1347-1350, 2009.
4. DICK, J. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J.; Zika virus: (I) Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**(5),509-520, 1952.
5. MACNAMARA, F. N.; Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **48**(2),139-145, 1954.
6. HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R.; HEANG, V.; HUY, R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C.; Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**(2), 2012.
7. KUNO, G.; CHANG, G. J. J.; Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **152**(4),687-696, 2007.
8. POSEN, H. J.; KEYSTONE, J. S.; GUBBAY, J. B.; MORRIS, S. K.; Epidemiology of Zika virus, 1947–2007. *BMJ Glob. Heal.* **1**(2), 2016.
9. KINDHAUSER, M. K.; ALLEN, T.; FRANK, V.; SANTHANA, R. S.; DYE, C.; Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull. World Health Organ.* **94**(9),675-686, 2016.
10. DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.;

- LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; ... HAYES, E. B.; Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**,2536-2543, 2009.
11. FARIA, N. R.; QUICK, J.; CLARO, I. M.; THÉZÉ, J.; DE JESUS, J. G.; GIOVANETTI, M.; KRAEMER, M. U. G.; HILL, S. C.; BLACK, A.; DA COSTA, A. C.; FRANCO, L. C.; SILVA, S. P.; WU, C. H.; RAGHWANI, J.; CAUCHEMEZ, S.; DU PLESSIS, L.; VEROTTI, M. P.; ... PYBUS, O. G.; Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature.* **546**(7658),406-410, 2017.
12. (WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION; Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome, 10 march 2017. *Situat. Rep.* (March),1-5, 2017.  
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254714/1/zikasitrep10Mar17-eng.pdf?ua=1>.
13. ZANLUCA, C.; DE MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. V.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K.; First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **110**(4),569-572, 2015.
14. ECDC, E. C. FOR D. P. AND C.; Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome, 10 December 2015. *Ecdc.* (December),1-14, 2015.
15. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.; *Vírus Zika No Brasil: A Resposta Do SUS [Recurso Eletrônico].*; 2017.  
[https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact\\_Sheet\\_Zika\\_Virus\\_Março16.pdf%0Ahttp://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus\\_zika\\_brasil\\_resposta\\_sus.pdf](https://sistemas.mre.gov.br/kitweb/datafiles/SaoFrancisco/pt-br/file/Fact_Sheet_Zika_Virus_Março16.pdf%0Ahttp://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf).

16. ALVARADO-SOCARRAS, J. L.; IDROVO, Á. J.; CONTRERAS-GARCÍA, G. A.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; AUDCENT, T. A.; MOGOLLON-MENDOZA, A. C.; PANIZ-MONDOLFI, A.; Congenital microcephaly: A diagnostic challenge during Zika epidemics. *Travel Med. Infect. Dis.* (December 2017), 2018.
17. PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A.; Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **374**(16),1552-1563, 2016.
18. CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A.; DE FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E. S. M.; DE SEQUEIRA, P. C.; DE MENDONÇA, M. C. L.; DE OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D. A.; SCHRAGO, C. G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; DOS SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R.; TANURI, A.; DE FILIPPIS, A. M. B.; Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* **16**(6),653-660, 2016.
19. BESNARD, M.; LASTÈRE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D.; Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance.* **19**(13),8-11, 2014.
20. HASTINGS, A. K.; FIKRIG, E.; Zika virus and sexual transmission: A new route of transmission for mosquito-borne flaviviruses. *Yale J. Biol. Med.* **90**(2),325-330, 2017.
21. HILLS, S. L.; RUSSELL, K.; HENNESSEY, M.; WILLIAMS, C.; OSTER, A. M.; FISCHER, M.; MEAD, P.; Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**(8),215-216, 2016.
22. WIWANITKIT, S.; WIWANITKIT, V.; Sexually transmitted Zika virus infection: a new tropical disease. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **6**(10),757-758, 2016.

23. MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C.; Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. *Euro Surveill.* **19**(November 2013),20761, 2014.
24. BONALDO, M. C.; RIBEIRO, I. P.; LIMA, N. S.; DOS SANTOS, A. A. C.; MENEZES, L. S. R.; DA CRUZ, S. O. D.; DE MELLO, I. S.; FURTADO, N. D.; DE MOURA, E. E.; DAMASCENO, L.; DA SILVA, K. A. B.; DE CASTRO, M. G.; GERBER, A. L.; DE ALMEIDA, L. G. P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VASCONCELOS, A. T. R.; BRASIL, P.; Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**(6),1-17, 2016.
25. DUPONT-ROUZEYROL, M.; BIRON, A.; CONNOR, O. O.; HUGUON, E.; DESCLOUX, E.; Correspondence Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet.* **387**(10023),1051, 2015.
26. PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M.; A.R., P.; A literature review of zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **22**(7),1185-1192, 2016.
27. ACADEMY, A.; ENTERPRISES, A. A. N.; ISSN, P.; ISSN, O.; Practice Parameter : Diagnostic assessment of the child with Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. 2009, 2009.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION; The WHO Child Growth Standards. <http://www.who.int/childgrowth/en/>. Published 2007. Accessed May 6, 2018.
29. DE ARAÚJO, T. V. B.; XIMENES, R. A. DE A.; MIRANDA-FILHO, D. DE B.; SOUZA, W. V.; MONTARROYOS, U. R.; DE MELO, A. P. L.; VALONGUEIRO, S.; DE ALBUQUERQUE, M. DE F. P. M.; BRAGA, C.; FILHO, S. P. B.; CORDEIRO, M. T.; VAZQUEZ, E.; CRUZ, D. DI C. S.; HENRIQUES, C. M. P.; BEZERRA, L. C. A.; CASTANHA, P. M. DA S.; DHALIA, R.; ... RODRIGUES, L. C.; Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk

- factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect. Dis.* **18**(March), 2017.
30. MARINHO, F.; ARAÚJO, V. E. M. DE; PORTO, D. L.; FERREIRA, H. L.; COELHO, M. R. S.; LECCA, R. C. R.; OLIVEIRA, H. DE; PONCIONI, I. P. DE A.; MARANHÃO, M. H. N.; MENDES, Y. M. M. B. E; FERNANDES, R. M.; LIMA, R. B. DE; RABELLO, D. DE L.; MARINHO, F.; ARAÚJO, V. E. M. DE; PORTO, D. L.; FERREIRA, H. L.; ... RABELLO, D. DE L.; Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. *Epidemiol. e Serviços Saúde.* **25**(4),701-712, 2016.
31. DOLK, H.; The Predictive Value of Microcephaly During the First Year of Life for Mental Retardation At Seven Years. *Dev. Med. Child Neurol.* **33**,974-983, 2008.
32. BARKOVICH AJ, FERRIERO DM, BARR RM, GRESSENS P, DOBYNS WB, TRUWIT CL, E. P.; Microlissencephaly: a heterogeneous malformation of cortical development. *Neuropediatrics.* **29**(3),113-119., 1998.
33. DE CARVALHO, N. S.; DE CARVALHO, B. F.; FUGAÇA, C. A.; DÓRIS, B.; BISCAIA, E. S.; Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: A review of literature and Brazilian data. *Brazilian J. Infect. Dis.* **20**(3),282-289, 2016.
34. PAN AMERICAN HEALTH ORGANISATION; Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. *Pan Am. Heal. Organ.* 2015,1-11, 2015. [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32405&lang=en)
35. SILASI, M.; CARDENAS, I.; KWON, J.; RACICOT, K.; ALDO, P.; MOR, G.; Viral Infections During Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**(3),199-213, 2015.

36. HIRSCH, A. J.; ROBERTS, V. H. J.; GRIGSBY, P. L.; HAESE, N.; SCHABEL, M. C.; WANG, X.; LO, J. O.; LIU, Z.; KROENKE, C. D.; SMITH, J. L.; KELLEHER, M.; BROECKEL, R.; KREKLYWICH, C. N.; PARKINS, C. J.; DENTON, M.; SMITH, P.; DEFILIPPIS, V.; ... STREBLOW, D. N.; Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat. Commun.* **9**(1),263, 2018.
37. (WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION; International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001, 2001. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Accessed April 3, 2019.
38. SAHAB, Z. J.; SEMAAN, S. M.; SANG, Q. A.; Methodology and Applications of Disease Biomarker Identification in Human Serum. *Biomark Insights.* **2**,21-43, 2007.
39. HOOPER, C.; LOVESTONE, S.; SAINZ-FUERTES, R.; Alzheimer ' s Disease , Diagnosis and the Need for Biomarkers. *Biomark Insights.* **44**(3),317-323, 2008.
40. AMBROSETTI, F.; JIMÉNEZ-GARCÍA, B.; ROEL-TOURIS, J.; BONVIN, A. M. J. J.; Modeling Antibody-Antigen Complexes by Information-Driven Docking. *Structure.* **28**(1),119-129.e2, 2020.
41. MULLER, D. A.; YOUNG, P. R.; The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* **98**(2),192-208, 2013.
42. KARIN STETTLER, MARTINA BELTRAMELLO, DIEGO A. ESPINOSA, VICTORIA GRAHAM, A.; CASSOTTA, SIRO BIANCHI, FABRIZIA VANZETTA, ANDREA MINOLA, STEFANO JACONI, FEDERICO MELE, MATHILDE FOGLIERINI, MATTIA PEDOTTI, LUCA SIMONELLI, STUART DOWALL, B. A.; ELENA PERCIVALLE, CAMERON P. SIMMONS, LUCA VARANI, JOHANNES BLUM, FAUSTO BALDANTI, ELISABETTA CAMERONI, ROGER HEWSON, EVA HARRIS,

- ANTONIO LANZAVECCHIA, FEDERICA SALLUSTO, \* DAVIDE CORTI; Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elucidated by Zika virus infection. *Science* (80-. ). **353**(6296),247-252, 2016.
43. SIROHI, D.; CHEN, Z.; SUN, L.; KLOSE, T.; PIERSON, T. C.; ROSSMANN, M. G.; KUHN, R. J.; The 3 . 8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* (80-. ). **5316**(March),1-7, 2016.
44. SONG, H.; QI, J.; HAYWOOD, J.; SHI, Y.; GAO, G. F.; Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**(5),456-458, 2016.
45. MAEDA, A.; MAEDA, J.; Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.* **195**(1),33-40, 2013.
46. VAN DER BURG, M.; WEEMAES, C. M. R.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; *Isotype Defects*. Elsevier Inc.; 2014.
47. CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; Zika MAC - ELISA. CDC. <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/non-eua-zika-mac-elisa-protocol.pdf>. Published 2018. Accessed June 22, 2018.
48. CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; Zika MAC-ELISA Protocol. 2018,28, 2018.
49. PANG, J.; CHIA, P. Y.; LYE, D. C.; LEO, Y. S.; Progress and challenges towards pointof-care diagnostic development for dengue. *J. Clin. Microbiol.* **55**(12),3339-3349, 2017.
50. SUN, C.; LIAO, X.; HUANG, P.; SHAN, G.; MA, X.; FU, L.; ZHOU, L.; KONG, W.; A self-assembled electrochemical immunosensor for ultra-sensitive detection of ochratoxin A in medicinal and edible malt. *Food Chem.* **315**(August 2019),126289, 2020.
51. DE CASTRO, A. C. H.; ALVES, L. M.; SIQUIEROLI, A. C. S.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; Label-free electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125 in serum. *Microchem. J.* **155**, 2020.

52. SAKAMOTO, S.; PUTALUN, W.; VIMOLMANGKANG, S.; PHOOLCHAROEN, W.; SHOYAMA, Y.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S.; Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J. Nat. Med.* **72**(1),32-42, 2018.
53. SAMARASEKERA, U.; TRIUNFOL, M.; Concern over Zika virus grips the world. *Lancet.* **387**(10018),521-524, 2016.
54. WANG, L.; FILER, J. E.; LORENZ, M. M.; HENRY, C. S.; DANDY, D. S.; GEISS, B. J.; An ultra-sensitive capacitive microwire sensor for pathogen-specific serum antibody responses. *Biosens. Bioelectron.* **131**(12),46-52, 2019.
55. FATONI, A.; AZIZ, A. N.; ANGGRAENI, M. D.; Low-cost and real-time color detector developments for glucose biosensor. *Sens. Bio-Sensing Res.* **28**(November 2019),100325, 2020.
56. PERUMAL, V.; HASHIM, U.; Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.* **12**(1),1-15, 2014.
57. KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K.; Introduction to Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* (June),1-68, 2015.
58. DA SILVA, E. T. S. G.; SOUTO, D. E. P.; BARRAGAN, J. T. C.; DE F. GIAROLA, J.; DE MORAES, A. C. M.; KUBOTA, L. T.; Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem.* **4**(4),778-794, 2017.
59. RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G.; *Electrochimica Acta* Review article A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochim. Acta.* **84**,74-83, 2012.
60. MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; CARVALHAL, R. F.; PERONI, L. A.; KUBOTA, L. T.; Development of an Electrochemical Immunosensor for. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**(4),795-801, 2009.
61. FELIX, F. S.; ANGNES, L.; Electrochemical immunosensors – A powerful

- tool for analytical applications. *Biosens. Bioelectron.* **102**,470-478, 2018.
62. BURCU BAHADIR, E.; KEMAL SEZGINTÜRK, M.; Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta.* **132**,162-174, 2015.
63. BANICA, F.-G.; Chapter 1 What are Chemical Sensors? In: *Chemical Sensors and Biosensors - Fundamentals and Applications*. Norway: John Wiley & Sons, Ltd; 2012:518p.
64. ZOUROB, M.; ELWARY, S.; KHADEMHOSEINI, A.; *Recognition Receptors in Biosensors*. 1st ed. (Zourob M, ed.). New York: Springer-Verlag; 2010.
65. YALOW, R. S.; BERSON, S. A.; Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* **184**,1648-1649, 1959.
66. KÖHLER, G.; MILSTEIN, C.; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* **256**(5517),495-497, 1975.
67. ABCAM; A comparison between polyclonal and monoclonal. Abcam. <https://www.abcam.com/protocols/a-comparison-between-polyclonal-and-monoclonal>.
68. DONALD VOET, JUDITH G. VOET, C. W. P.; Section 5-2 Protein Purification and Analysis. In: *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level.* ; 2008:95.
69. DOS SANTOS RICCARDI, C.; DA COSTA, P. I.; YAMANAKA, H.; Imunossensor amperométrico. *Quim. Nova.* **25**(2),316-320, 2002.
70. LOU, Z.; JOTHI, J. S.; Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants. *Nusant. Biosci.* **6**(2), 2014.
71. PAN, M.; GU, Y.; YUN, Y.; LI, M.; JIN, X.; WANG, S.; Nanomaterials for electrochemical immunosensing. *Sensors (Switzerland).* **17**(5), 2017.
72. RUSLING, J. F.; Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for proteins. *Chem. Rec.* **12**(1),164-176, 2012.
73. AYDIN, S.; A short history, principles, and types of ELISA, and our

- laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. **72**,4-15, 2015.
74. NICOLINI, A. M.; MCCracken, K. E.; YOON, J. Y.; Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. *J. Biol. Eng.* **11**(1),1-9, 2017.
75. FARIA, A. M.; MAZON, T.; Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. *Talanta*. **203**(April),153-160, 2019.
76. AFSAHI, S.; LERNER, M. B.; GOLDSTEIN, J. M.; LEE, J.; TANG, X.; BAGAROZZI, D. A.; PAN, D.; LOCASCIO, L.; WALKER, A.; BARRON, F.; GOLDSMITH, B. R.; Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. *Biosens. Bioelectron.* **100**,85-88, 2018.
77. CABRAL-MIRANDA, G.; CARDOSO, A. R.; FERREIRA, L. C. S.; SALES, M. G. F.; BACHMANN, M. F.; Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals. *Biosens. Bioelectron.* **113**,101-107, 2018.
78. KAUSHIK, A.; YNDART, A.; KUMAR, S.; JAYANT, R. D.; VASHIST, A.; BROWN, A. N.; LI, C.-Z.; NAIR, M.; A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. *Sci. Rep.* **8**(1),9700, 2018.
79. RUSLING, J. F. ET AL.; Measurement of biomarker for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst*. **135**(10),2496-2511, 2010.
80. AHIRWAL, G.; MITRA, C.; Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase-Gold Nanoparticles Conjugate. *Sensors (Switzerland)*. **9**,881-894, 2009.
81. VEITCH, N. C.; Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. **65**,249-259, 2004.
82. NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L.; Eletrodos fabricados por “silk-screen.”

- Quím. Nov. **21**(5),614-629, 1998.
83. JANECZEK, K.; KOZIOŁ, G.; JAKUBOWSKA, M.; ARAŻNA, A.; MŁOZNIAK, A.; FUTERA, K.; Assessment of electromechanical properties of screen printed polymer nanopastes. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **178**(8),511-519, 2013.
84. WINDMILLER, J. R.; BANDODKAR, A. J.; PARKHOMOVSKY, S.; WANG, J.; Stamp transfer electrodes for electrochemical sensing on non-planar and oversized surfaces. *Analyst.* **137**(7),1570-1575, 2012.
85. OKIMOTO, H.; TAKENOBU, T.; YANAGI, K.; MIYATA, Y.; SHIMOTANI, H.; KATAURA, H.; IWASA, Y.; Tunable carbon nanotube thin-film transistors produced exclusively via inkjet printing. *Adv. Mater.* **22**(36),3981-3986, 2010.
86. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; FARIA, R. C.; Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. *Talanta.* **146**,381-387, 2016.
87. THIYAGARAJAN, N.; CHANG, J. L.; SENTHILKUMAR, K.; ZEN, J. M.; Disposable electrochemical sensors: A mini review. *Electrochem. commun.* **38**,86-90, 2014.
88. DU, C. X.; HAN, L.; DONG, S. L.; LI, L. H.; WEI, Y.; A novel procedure for fabricating flexible screen-printed electrodes with improved electrochemical performance. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **137**(1), 2016.
89. MOHAMED, H. M.; Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **82**,1-11, 2016.
90. BANKS, C. E.; FOSTER, C. W.; KADARA, R. O.; *Screen-Printing Electrochemical Architectures.*; 2016.

91. BANGE, A.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R.; Microfluidic immunosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* **20**(12),2488-2503, 2005.
92. DE OLIVEIRA, R. A. G.; MATERON, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L.; FARIA, R. C.; Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **9**(33),27433-27440, 2017.
93. DE OLIVEIRA, T. R.; MARTUCCI, D. H.; FARIA, R. C.; Simple disposable microfluidic device for Salmonella typhimurium detection by magneto-immunoassay. *Sensors Actuators, B Chem.* **255**(August),684-691, 2018.
94. FREITAS, T. A.; PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; MAGNANI, R. F.; FARIA, R. C.; Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. *Talanta.* **205**(June),120110, 2019.
95. SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M.; Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis.* **24**(21),3563-3576, 2003.
96. ILIESCU, C.; JING, J.; TAY, F. E. H.; MIAO, J.; SUN, T.; Characterization of masking layers for deep wet etching of glass in an improved HF/HCl solution. *Surf. Coatings Technol.* **198**(1-3 SPEC. ISS.),314-318, 2005.
97. CHIKKAVEERAI AH, B.V.; LIU, H.; MANI, V.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; RUSLING, J. F.; A microfluidic electrochemical device for high sensitivity biosensing: Detection of nanomolar hydrogen peroxide. *Electrochem. commun.* **11**(4),819-822, 2009.
98. ROMANOV, V.; SAMUEL, R.; CHAHARLANG, M.; JAFEK, A. R.; FROST, A.; GALE, B. K.; FDM 3D Printing of High-Pressure, Heat-Resistant, Transparent Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **90**(17),10450-10456, 2018.
99. AGUILAR-ARTEAGA, K.; RODRIGUEZ, J. A.; BARRADO, E.; Magnetic solids

- in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta.* **674**(2),157-165, 2010.
100. HE, J.; HUANG, M.; WANG, D.; ZHANG, Z.; LI, G.; Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101**,84-101, 2014.
101. MODH, H.; SCHEPER, T.; WALTER, J.-G.; Aptamer-Modified Magnetic Beads in Biosensing. *Sensors (Basel)*. **18**(4),1041, 2018.
102. RUSLING, J. F.; Nanomaterials-Based Electrochemical Immunosensors for Proteins. *Chem Rec.* **12**(1),164–176, 2012.
103. CENTI, S.; LASCHI, S.; MASCINI, M.; Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta.* **73**(2),394-399, 2007.
104. ULIANA, C. V.; PEVERARI, C. R.; AFONSO, A. S.; COMINETTI, M. R.; FARIA, R. C.; Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker. *Biosens. Bioelectron.* **99**(July 2017),156-162, 2018.
105. PEDRERO, M.; DE VILLENA, F. J. M.; MUÑOZ-SAN MARTÍN, C.; CAMPUZANO, S.; GARRANZO-ASENSIO, M.; BARDERAS, R.; PINGARRÓN, J. M.; Disposable Amperometric Immunosensor for the Determination of Human P53 Protein in Cell Lysates Using Magnetic Micro-Carriers. *Biosensors.* **6**(4),56, 2016.
106. JANÁKY, C.; HURSÁN, D.; ENDRÖDI, B.; CHANMANEE, W.; ROY, D.; LIU, D.; DE TACCONI, N. R.; DENNIS, B. H.; RAJESHWAR, K.; Electro- and Photoreduction of Carbon Dioxide: The Twain Shall Meet at Copper Oxide/Copper Interfaces. *ACS Energy Lett.* **1**(2),332-338, 2016.
107. FERREIRA, L.; ZANOTTO, P.; DURIGON, E. L.; Teste detecta infecção anterior pelo vírus Zika. FAPESP.
108. KANNO, A. I.; LEITE, L. C. DE C.; PEREIRA, L. R.; DE JESUS, M. J. R.;

- ANDREATA-SANTOS, R.; ALVES, R. P. DOS S.; DURIGON, E. L.; FERREIRA, L. C. DE S.; GONÇALVES, V. M.; Optimization and scale-up production of Zika virus ΔNS1 in Escherichia coli: application of Response Surface Methodology. *AMB Express*. **10**(1),1-13, 2020.
109. AL, W. S. . ET AL.; Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**,518-528, 2007.
110. PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; FREITAS, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; DURÁN, A. A.; MELENDEZ, M. E.; ZAMBRANO, G.; FARIA, R. C.; Novel enzyme-free immunomagnetic microfluidic device based on Co 0.25 Zn 0.75 Fe 2 O 4 for cancer biomarker detection. *Anal. Chim. Acta.* **1071**(xxxx),59-69, 2019.
111. ELGRISHI, N.; ROUNTREE, K. J.; MCCARTHY, B. D.; ROUNTREE, E. S.; EISENHART, T. T.; DEMPSEY, J. L.; A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **95**(2),197-206, 2018.
112. AHAMMAD, A. J. S.; Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin. *J. Biosens. Bioelectron.* **s9**,1-11, 2012.
113. CATALDO, V.; VAZE, A.; RUSLING, J. F.; Improved Detection Limit and Stability of Amperometric Carbon Nanotube-Based Immunosensors by Crosslinking Antibodies with Polylysine. *Electroanalysis.* **20**(2),115-122, 2008.
114. DEVARAKONDA, S.; SINGH, R.; BHARDWAJ, J.; JANG, J.; Cost-Effective and Handmade Paper-Based Immunosensing Device for Electrochemical Detection of Influenza Virus. *Sensors (Basel).* **17**(11),2597, 2017.
115. THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **74**(5),835-855, 2002.
116. SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W. A.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; MCKAY, G.; MILLER, K. J.; PATNAIK, R. N.; POWELL,

- M. L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C. T.; YACOBI, A.; Bioanalytical method validation - A revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17**(12),1551-1557, 2000.
117. AOAC; Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *AOAC Int.* 2016,1-17, 2016.
118. PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K. M.; HUDSON, W. H.; ONLAMOON, N.; SEWATANON, J.; EDUPUGANTI, S.; PATTANAPANYASAT, K.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MULLIGAN, M. J.; WILSON, P. C.; AHMED, R.; SUTHAR, M. S.; WRAMMERT, J.; Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**(28),7852 LP - 7857, 2016.
119. KEASEY, S. L.; PUGH, C. L.; JENSEN, S. M. R.; SMITH, J. L.; HONTZ, R. D.; DURBIN, A. P.; DUDLEY, D. M.; O'CONNOR, D. H.; ULRICH, R. G.; Antibody responses to Zika virus infections in environments of Flavivirus endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* **24**(4),1-16, 2017.
120. KAREINEN, L.; HEPOJOKI, S.; HUHTAMO, E.; KORHONEN, E. M.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; HEDMAN, K.; HEPOJOKI, J.; VAPALAHTI, O.; Immunoassay for serodiagnosis of Zika virus infection based on time-resolved Förster resonance energy transfer. *PLoS One.* **14**(7),e0219474-e0219474, 2019.
121. SPEER, S. D.; PIERSON, T. C.; Diagnostics for Zika virus on the horizon. *Science (80-. ).* **353**(6301),750 LP - 751, 2016.
122. ALLONSO, D.; MENESES, M. D. F.; FERNANDES, C. A.; FERREIRA, D. F.; MOHANA-BORGES, R.; Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* **9**(11),6-8, 2014.
123. ANTUNES, P.; WATTERSON, D.; PARMVI, M.; BURGER, R.; BOISEN, A.; YOUNG, P.; COOPER, M. A.; HANSEN, M. F.; RANZONI, A.; DONOLATO, M.; Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic

- nanocluster detection. *Sci. Rep.* **5**(July),1-10, 2015.
124. ROCHA, L.; ALVES, R.; CAETANO, B.; PEREIRA, L.; MITSUNARI, T.; AMORIM, J.; POLATTO, J.; BOTOSSO, V.; GALLINA, N.; PALACIOS, R.; PRECIOSO, A.; GRANATO, C.; OLIVEIRA, D.; SILVEIRA, V.; LUZ, D.; FERREIRA, L.; PIAZZA, R.; Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies. *Antibodies.* **6**(4),14, 2017.
125. FELIX, A. C.; SOUZA, N. C. S.; FIGUEIREDO, W. M.; COSTA, A. A.; INENAMI, M.; DA SILVA, R. M. G.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S.; ROMANO, C. M.; Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J. Med. Virol.* **89**(8),1477-1479, 2017.